Exhibit 1

(19) 日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)特許出願公表擔号

特表2004-500042 (P2004-500042A)

			(43) 公委日	平成16年1月8日(2004, 1.8)
(51) Int. C1.7	F)			テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A 6 1 K 35/74	ASIK	35/74	A	4B065
A61K 38/00	A61K	45/00		4C084
A 6 1 K 38/43	A61K	48/00		4C087
A 6 1 K 45/00	ASIP	35/00		4H045
-	報查路 求	未清束	予備審査請求 有	(金 200 頁) 最終質に続く
(21) 出願證号	特第2001-528552 (P2001-528552)	(71) 出版	人 500115262	
(86) (22) 出願日	平成12年8月24日 (2000, 8, 24)		ヴァイオン フ	ファーマシューティカルズ、
(8\$) 翻訳文操出日	平成14年4月4日 (2002、4、4)		インコーポレー	ーテッド
(88) 国際出頭番号	PCT/US2000/023242		アメリカ合衆担	06511 コネチカッ
(87) 国際公開番号	W02001/025397		ト州、ニュー	ヘイブン、フォー サイエ
(87) 国際公開日	平成13年4月12日 (2001, 4, 12)		ンス パーク	(環境なし)
(31) 優先穩主張新号	60/157,500	(74) 代理	人 100091096	
(32) 優先日	平成11年10月4日 (1999, 10.4)		介理士 平本	花 輪
(33) 優先標業振回	*国 (US)	(74) 代班	人 100118773	
(31) 優先權主張新号	60/157,581		弁理士 凝固	200
(32) 優先日	平成11年10月4日 (1999, 10.4)	(74) 代理	人 100098188	
(33) 優先橋主張國	*国 (US)		弁理士 石井	貞次
(31) 優先機主要备号	60/157,637	1		
(32) 優先日	平成11年10月4日 (1599, 10, 4)	1		
(33) 優先權立張國	米島 (US)			
				最終頁に続く

(54) 【発頭の名称】エフェクター分子の種為高的瓷道のための総財物および分法

(57)【要約】

本出開は、國際運動の端位と1つ以上の一次エフェクタ ・分子を送達するための標準化値解距的網笛(atte nuated tumor=targeted bact eria) ベクターの作数ならびた使用を倒示する。本 来例の一次エフェクター分子は、酸無、風色態、円 無し、一般などの固能極端品を治療するために本契例の方 法において用いられる。本理側は、借主に全費枠与さる が出されて用いられる。本理側は、借主に全費枠与る が出されて用いられる。本理側は、借主に全費枠与る が出されて用いられる。本理側は、 市区との事件を使用する。本理側は 所当されるという賢くやを如見に関する。本田側はま た、一次エフェクター分子と外は任務の上でエクター分子 よって設定されたの一般に所示する。

【特許請求の範囲】

【牆求道1】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコード する1つ以上の核酸分子を含む、過性好気性菌または再性嫌気性菌である弱素化腫瘍績的 細菌。

【請求項2】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む、過性好気性菌または過性蒸気性面である調査化腫瘍模的細菌。

【請求項3】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項1 または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

[請求佰4]

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子。(TNF-a)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 陶蓮ボトシス誘導性リガンド(TRAIL)、TNF- α 隔道は比により誘導されるサイトカイン(TRANCB)、TNF- α 開連の弱いアポトーシス誘導物質(TWEAK)、CD40リガンド(CD40L)、LT- α 、LT- β 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項3に記象の弱奪化腫瘍線的細菌。

【請求項5】 一次エフェクター分

一次エフェクター分子の少なくとも1つが銃血管新生因子である、繭求項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項6】

【請求項7】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがパクテリオシンファミリーのメンバーであるが、 ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項1または2に配載の弱奏化腫瘍標的 細菌。

【請求項8】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、ColE2、ColE3、ColE5、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8 40、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシDF13、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、プチリシン7423、ピオシンR1bしくはAP41、メガシンA-216、ピブリオシン、またはミクロシンM15である。 湯来資7に記載の職跡化騰密標的細菌。

【請求項9】

一次エフェクター分子が順島阻害酵素である、請求項1または2に記載の弱端化腫瘍標的 細菌。

【請求項101

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リバーゼ、ホスホリバーゼ、プロテアーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項9に記載の弱毒化腫瘍標的 50

細菌。

【蕭求項111

一次エフェクター分子がヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、またはPMTである、請求項1または2に記載の報告化腫瘍標的細菌。

【請求項12】

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求 項1または2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項 1 3 】

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換醛素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、購求項 2 に記載の弱率化腫瘍極的細菌。 【論文項 1 4 】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ(Saimoneila)である、請求項1または2に 記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

【請求項15】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項1に記載の弱毒化腫瘍標的 細菌。

™困。 【請求項16】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子 (BRP) である、請求項2に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

「爾東東 17] つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1 つ以上の核酸分子を含む、適性好気性菌または適性嫌気性菌である弱毒化腫瘍線的細菌で あって、該融合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上配弱毒化腫瘍 様的細菌。

【請求項18】

1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1 つ以上の核酸分子を含む、通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍繰的細菌で あって、該融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記弱毒化 瞬環機的細菌

【請求項19】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項18に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。 【請求項20】

シグナル配列がOmpA様タンパク質である、請求項17または19に記載の弱毒化腫瘍 標的細菌。

【請求項21】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ベネトラキシン)、カボジ繊維学細胞増殖因子 (FGF) 胰移行性配列 (MTS)、単純ヘルペスウィルスVP22、ベキサレスチジン、ベキサリシン、またはヘキサアルギニンから誘導される、満来項13または19に記載の弱毒化腫瘍種的細菌。

[請求項22]

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項17、18または1 9に記載の弱毒化腫瘍標的細菌。

[請求項23]

影拳化艦事構的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェ クター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、繭水頂17、18または19 に記載の影響化艦事様的細菌。

【請求項24】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項23に記載の弱毒化 腫瘍標的細菌。

【請求項25】

50

20

製薬上許容される担係と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次 エックター分子をコードする1つ以上の友酸分子を含む適性好気性菌または適性嫌気性 菌である那等化腫瘍接的細菌と、を含有する医薬組成物。

[請求項26]

製業上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次 エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分 子を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍膜的細菌と、を含有する医薬 組成物。

【請求項27】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項2 10 5または26に記載の医薬組成物。

【請求項28】

TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF $-\alpha$)、腫瘍壊死因子 β (TNF $-\beta$)、TNF $-\alpha$ 同聴っポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF $-\alpha$ 同聴った性化により誘導されるサイトカイン(TRANCE)、TNF $-\alpha$ 同連の弱いアナーシス誘導物質 (TWBAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT $-\alpha$ 、LT $-\beta$ 、OX40L、CD40L、FasL、CD27L、CD30L、4-1BBL、APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR—Lである、請求項27に記載の医率組成物。

【請求項29】 一次エフェクケー分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、請求項25または26 に新量の疾薬組成物。

[請來項301

統画管新生図子が、エンドスタナン、アンギオスタナン、抗血管新生アンチトロンピン I II、フィブロネクナンの29 k Da N末端および40 kDa C末端ウンパク質分解断片、血ト 会容体アンタン29 kDa N末端および40 kDa C末端ウンパク質分解断片、血小 被第4 因子の穴。 8 k Da タンパク質分解断片、血小 被第4 因子の抗血管新生 2 4 アミノ 宮 メス マンリ の抗血管 新生 2 2 アミノ 酸ペプチド断片、 R G D および N G R を含むペプチド断片、 S P A R C の抗血管新生 2 0 アミノ酸ペプチド断片、 R G D および N G R を含むペプチド ド・ ラミニン、フィブロネクチン、ブロコラーゲンもしくは E G F のからい抗血管新生ペプチド、またはインチグリン α、β、もしくは V B G F 委体体のペプ チドアンタゴニストである、 請求項 2 9 に記載の 医薬組成物。

一次エフェクター分子の少なくとも1つがパクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、該パクテリオシンはBRPでない、講求項25または26に記載の医案組成物

【請求項32】

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColEl、ColEla、ColElb、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE3、ColE6、ColE7、ColE3、ColE6、ColE7、ColE3、ColE6、ColE7、ColE3、4、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL580、プチリシン7423、ピオシンR1もLくはAP41、メガシンA-216、ピブリオシン、またはミクロシンM15である。請求項31に記載の医薬組成物。

一次エフェクター分子が腫瘍阻害酸素である、請求項25または26に記載の医薬組成物

【請求項33】 一次エフェクタ 。 【請求項34】

艦島国舎醛素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リバーゼ、ホスホリバーゼ、プロテァーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、端末項33に記載の医薬組成物。 【歳末項351

少なくとも1つの一次エフェクター分子がヘモリシン、ベロ毒素、CNF1、CNF2、 またはPMTである、請求項25または26に記載の医薬組成物。

【欝求項36】 一次エアエクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、欝求 項25または26に記載の医薬組成物。

【請求項37】

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗魔瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチ センス分子、リポザイム、または抗原である、請求項26に記載の医薬組成物。

【請求項38】

弱毒化腫瘍様的細菌がサルモネラ (Salmonella) である、欝水項25または2 10 6に記載の医薬組成物。

【壽求項39】

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項25に記載の医薬組成物。 【請求項40】

二次エフェクター分子がバクテリオシン放出因子である、請求項26に記載の医薬組成物

[請求項4]]

製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に適結された1つ以上の融合 タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を含む過性好気性菌または過性嫌気性菌であ る別な化臓系標的細菌と、を含有する医薬組成物であって、設融合タンパク質がシグナル 20 配列をエフェクター分子からなる、上記医薬組成物。

【請求項42】

聚業上許容をおる担債と、1つ以上のプロモーターに機能的に遷結された1つ以上の融合 ウンパン質をコードする1つ以上の検酸分子を含む過性好気性菌または過性嫌気性菌である る弱毒化腫瘍情的細菌と、を含有する医薬組成物であって、液酸合タンパク質がフェリー ペプチドとよフェクター分子からなる、上記医薬組成物。 「酸水質 3」

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項42に記載の医薬組成物。

【請求項 4 4 】 シグナル配列が○mpA様タンパク質である、請求項 4 1 または 4 3 に記載の医薬組成物 30

【諸水項 4 5 】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ベネトラキシン)、カボジ繊維季細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS)、単純へルペスウイルス VP 2 2、ヘキサヒスチジン、ヘキサリン、またはヘキサアルギニンから誘導される、顕来項4 2 または 4 3 に記載の医認知は物。

【請求項46】

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項41、42または4 3に記載の医薬組成物。

[請求項47]

影拳化匯審構的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェ クター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項41、42または43 に配額の医薬組成物。

【請求項48】

国部艦爆爆の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1 つ以上の一次エフェク クー分子を活達する方法であって、製薬上許容される担体と、1 つ以上のプロモーター 機能的に連結された1 つ以上の一次エフェクター分子をコードする1 つ以上の核酸分子を 含む海性肝気性菌または海性韓気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成 物を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項49】

国彩腫墨傷の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の一次エフェク クー分子と1つ以上の二次エフェクター分子を送達する方法であって、製薬上許容される 担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に遠結された1つ以上の一次エフェクター分子 および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含む過性好気 性菌または過性輸気性菌である弱毒化順瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与する ことを含んでなる上記方法。

【請求項50】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである、請求項4 8または49に記載の方法。

8まだは49に記載の方法。

【請求項51】 TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子 α (TNF $-\alpha$)、腫瘍壊死因子 β (TNF $-\alpha$)、 TNF $-\alpha$ 同連ァボトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF $-\alpha$ 同連 活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCB)、TNF $-\alpha$ 関連の弱いアボトーシス誘導物質 (TWEAK)、CD40リガンド (CD40L)、LT $-\alpha$ 、LT $-\beta$ 、OX40L、CD40L、TPasL、CD27L、CD30L、4 $-\alpha$ 1BBL APRIL、LIGHT、TL1、TNFSF16、TNFSF17、またはAITR-Lである、請求項50に記載の方法。[請求項522]

ー次エフェクター分子の少なくとも1つが抗血管新生因子である、繭求項48または49 に記載の方法。

【請求項53】

【請求項54】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがパクテリオシンファミリーのメンバーであるが 、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項48%たは49に記載の方法。

[編水項55]

パクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1。ColE1b、ColE2、ColE3、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE6、ColE7、ColE6、ColE7、ColE7、ColE8、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13、ベスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、ブチリシン 7423、ピオシンR1もしくはAP41、メガシンA-216、どブリオシン、またはミクロシンM15である、繭束項54に配数の方法。

【請求項56】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが順瘍阻害酵素である、繭水項48または49に 記載の方法。

【満水項57】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテ アーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項56に記載の方法。 「請求項581

【桐水坝のる♪ 一次エフェクター分子の少なくとも1つがヘモリシン、ベロ毒素、CNF1、CNF2、

またはPMTである、請求項48または49に記載の方法。 【請求項59】

10

30

一次エフェクター分子の少なくとも1つが動物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求項48または49に記載の方法。

【請求項60】

二次エフェクター分子の少なくとも1つが流腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチセンス分子、リボザイム、または抗原である、簡末項49に記載の方法。 【編末項61】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ(Salmonella)である、請求項48または4

9に記載の方法。 【請求項621

弱端化鹽瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項48に記載の方法。

【請求項63】

二次エフェクター分子がパクテリオシン放出因子である、講求項49に記載の方法。 【請求項64】

国形腫瘍病の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の融合タンパク 膏を透過する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的 に連結されて1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の対度分子を含む機性好気 性菌または過性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を投与する ことを含んでなり、設酸合タンパク質がシグナル配列とエフェクター分子からなる、上記 方法。

[請求項65]

■影腫寒癌の治療のために、そのような治療が必要な被験者に、1つ以上の融合タンパク質を透達する方法であって、職業上許容される担体と、1つ以上のガロモーターに機能のは連結された1つ以上の競合タンパク質を力をつる1つ以上の放野分子を含む過程好気性菌または過性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物を役与することを含んでなり、設融合タンパク質がフェリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項66】

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

シグナル配列がOmpA様タンパク質である、請求項64または66に記載の方法。 【請求項68】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ベ ネトラキシン)、カボジ繊維等細胞増殖因子 (F G F) 膜移行性配列 (M T S)、単純へ ルペスウイルスVF22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンか ら誘導される、講家項65または66に記載の方法。

[請求項69]

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項64、65または6 6に記載の方法。

【請求項70】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェ 40 クター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項64、65または66 に記載の方法。

【 請求道 7 1 1

動物の国彩腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上計容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含め過程対気性菌または通性療気性菌である弱癖化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる上記方法。

【請求項72】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、観薬上許容される担体と、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上の一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフ 50

ェクター分子をコードする1つ以上の核磁分子を含む通性妊気性菌または通性療気性菌で ある弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与 することを含んでなる上記方法。

【請求項73】

一次エフェクター分子の少なくとも1つがTNFファミリーのメンバーである。 篇末項? 1または72に記載の方法。

【請求項741

 $TNFファミリーのメンバーが、腫瘍壊死因子<math>\alpha$ ($TNF-\alpha$) 、腫瘍壊死因子 β (TNF-β)、TNF-α関連アポトーシス誘導性リガンド(TRAIL)、TNF-α関連 活性化により誘導されるサイトカイン(TRANCE)、TNF-a関連の弱いアポトー 10 シス誘導物質 (TWEAK) 、CD40リガンド (CD40L) 、LT-α、LT-8、 OX40L, CD40L, Fast, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRI L, LIGHT, TL1, TNFSF16, TNFSF17, #tdAITR-L cas 、請求項73に記載の方法。

【請求項75】 一次エフェクター分子の少なくとも1つが統血管新生因子である、請求項71または72 に記載の方法。

【請求項76】

抗血管新生因子が、エンドスタチン、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビン「 II、フィブロネクチンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断 20 片、 a P A 受容体アンタゴニスト、プロラクチンの 1 6 k D a タンパク質分解断片、血小 被第4因子の7.8kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の抗血管新生24アミノ 酸断片、13、40と称する抗血管新生因子、トロンボスポンジン Tの抗血管新生 2.2 ア ミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよび NGRを含むペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの 小さい抗血管新生ペプチド、またはインテグリン α 。 β 。もしくはVEGF 受容体のペプ チドアンタゴニストである、請求項75に記載の方法。

[譜求項77]

一次エフェクター分子の少なくとも1つがパクテリオシンファミリーのメンバーであるが 、ただし、該バクテリオシンはBRPでない、請求項?1または?2に記載の方法。 [請求項78]

バクテリオシンファミリーのメンバーが、ColE1、ColE1a、ColE1b、C olE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE8 、ColE9、コリシンA、コリシンK、コリシンL、コリシンM、クロアシンDF13 、ペスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、ブチリシン7423、ビオシン R1もしくはAP41、メガシンA-216、ピブリオシン、またはミクロシンM15で

ある、請求項77に記載の方法。 【請求項79】

一次エフェクター分子の少なくとも1つが腫瘍阻害酵素である、請求項71または72に 記載の方法。

【請求項80】

腫瘍阻害酵素が、メチオナーゼ、アスパラギナーゼ、リバーゼ、ホスホリパーゼ、プロテ アーゼ、DNAアーゼ、またはグリコシダーゼである、請求項79に記載の方法。

一次エフェクター分子の少なくとも1つがヘモリシン、ペロ毒素、CNF1、CNF2、 またはPMTである、繭末頭71または72に記載の方法。

[請求項82]

一次エフェクター分子が動物、植物、細菌、またはウイルスに由来するものである、請求 項71または72に記載の方法。

【請求項831

二次エフェクター分子が免疫調節剤、抗腫瘍タンパク質、プロドラッグ変換酵素、アンチ センス分子、リボザイム、または銃原である、箭求項82に記載の方法。

【請求項84】

弱毒化腫瘍標的細菌がサルモネラ(Salmonella)である、請求項71または7 2に記載の方法。

[請求項85]

弱毒化腫瘍標的細菌が増強された放出系をさらに含む、請求項71に記載の方法。

[請求項86] 二次エフェクター分子がパクテリオシン放出因子である、請求項72に記載の方法。

[請求項87]

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモ ーターに機能的に連結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子 を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的霜菌と、を含有する医薬組 威物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がシ グナル配列とエフェクター分子からなる、上記方法。

【請求項88】

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と、1つ以上のプロモ ーターに機能的に適結された1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子 を含む通性好気性菌または通性嫌気性菌である弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組 成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなり、該融合タンパク質がフ 20 エリーペプチドとエフェクター分子からなる、上記方法。

[請求項89]

融合タンパク質がシグナル配列をさらに含む、請求項88に記載の方法。

[請求項90]

シグナル配列がOmpA様タンバク質である、請求項87または89に記載の方法。

【請求項91】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペティアホメオドメイン (ペ ネトラキシン)、カボジ繊維芽細胞増殖因子 (FGF) 腕移行性配列 (MTS)、単純へ ルペスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンか ら誘導される、請求項88または89に記載の方法。 [請求項92]

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項87、88または8 9に記載の方法。

【請求項93】

弱毒化腫瘍標的細菌が、1つ以上のプロモーターに機能的に連結された1つ以上のエフェ クター分子をコードする1つ以上の核酸分子をさらに含む、請求項87、88または89 に記載の方法。

[請求項94]

動物の固形腫瘍癌を治療する方法であって、製薬上許容される担体と弱毒化腫瘍標的細菌 とを含有する医薬組成物、および1つ以上の化学療法剤を投与することを含んでなる、上 40 記方法。

【請求項95】

OmpA様タンパク質およびエフェクター分子からなる融合タンパク質。

【請求項96】 シグナル配列、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる融合タンパク質。

[請求項97]

シグナル配列がOmpA様タンパク質である、請求項96に記載の融合タンパク質。

「鯖水項98】

フェリーペプチドが、HIV TATタンパク質、アンテナペディアホメオドメイン (ペ ネトラキシン)、カボジ繊維芽細胞増殖因子(FGF)腕移行性配列(MTS)、単純へ 59 ルベスウイルスVP22、ヘキサヒスチジン、ヘキサリシン、またはヘキサアルギニンか ら誘導される、請求項96に記載の融合タンパク質。

[請求項99]

エフェクター分子が一次または二次エフェクター分子である、請求項95または96に記 載の融合タンパク智。

【発明の詳細な説明】

[0 0 0 1]

本出願は1999年10月4日出願の米回仮特許出願60/157,500、60/15 7.581、及び60/157.637に対する優先格を主張し、それらの各々の内容は 参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。 [00002]

1. 発明の分野

本発明は、固影腫瘍を治療又は阻害するための、固形膿瘍への 1 種以上の一次エフェクタ ー分子(1種もしくは複数種)の送達に関する。特には、本発明は、適切な作用部位、例 えば、固形腫瘍の部位に1種以上の一次エフェクター分子(1種もしくは複穀種)を送達 するためのベクターとしての弱毒化腫瘍薬的細菌(attenuated tamortargeted bacteria)、例えばサルモネラ (Salmonella)、 の調製及び使用に関する。特には、本発明の弱毒化腫瘍標的細菌は、1種以上の一次エフ エクター分子 (1種もしくは複数種) をコードするように改変されている通性好気性繭又 は通性嫌気性菌である。本発明の一次エフェクター分子 (1種もしくは複数種) には、T 20 NFサイトカイン・ファミリーのメンバー、抗血管新生因子、及び細胞傷害性ポリペプチ ドもしくはペプチドが含まれる。本発明の一次エフェクター分子は、例えば、癌腫、黒色 腫、リンパ腫、肉腫、又はこれらの腫瘍から誘導される転移物のような固形腫瘍癌の治療 に有用である。本発明は、さらに、一次エフェクター分子 (1種もしくは複数種)、例え ば、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、及び細胞傷害性ポリペプチドもしく はペプチドを、宿主に対する毒性及び免疫学的合併症を低下させた弱素化腫瘍標的細菌に よって贈瘍に局所送途できるという驚くべき発見に関する。また、本発明は、一次エフェ クター分子 (1種もしくは複数種)と共に弱癌化腫瘍標的細菌によって送達することがで きる 1種以上の任意のエフェクター分子 (1種もしくは複数種) (「二次エフェクター分 子」と呼ばれる)の送達にも関する。この二次エフェクター分子(1種もしくは複数種) 30 はさらなる抗腫瘍治療活性を提供し、弱寒化腫瘍標的細菌からの一次エフェクター分子(1種もしくは複数種)の放出を増強し、及び/又は適切な作用部位、例えば、固形腫瘍の 部位での一次エフェクター分子 (1種もしくは複数種) の取り込みを増強する。

[0 0 0 0 3]

2. 発明の背景

新生物、すなわち順源は異常な細胞の増殖の結果生じる新生物塊であり、良性又は悪性で あり得る。良性腫瘍は、一般には、局在したままである。悪性腫瘍は、一般には、廃接体 組織に浸潤してそれを破壊する潜在能力を有し、離れた部位まで広がって死を引き起こす (レビューには、Robins and Angell, 1976, Basic Pat hology, 2d Ed. W. B. Saunders Co., Philadelp 40 hia, pp. 68-122 を参照)。腫瘍は、ある器官もしくは組織から別のものに 広がったときに転移していると言われる。

[0004]

固彩腫瘍癌の化学療法における主な問題は、同時に正常細胞に対する損傷を最小にしなが らの、腫瘍細胞を根絶するのに十分な濃度での治療作用物質、例えば、薬物の送達である 。したがって、多くの研究室における研究は生物学的送達系、例えば、薬物を標的送達す るための抗体、サイトカイン、及びウイルス、プロドラッグ変換酵素、及び/又は腫瘍細 胞に入れる遺伝子の設計に向けられている(例えば、Cェッstat、 R、G... 19 95. Science 270:404-110 を鈴照)。

[0005]

2、1、細胞性免疫及びサイトカイン

癌を治療するための方策の1つは、細胞性免疫応答を増強又は活性化することを含む。自 己腫瘍に向けられた細胞性免疫応答をうまく誘導することで従来の化学療法を上回る幾つ かの利点が得られる: 1) 免疫認識は高度に特異的であり、鎌値的に腫瘍に向かう; 2) 免疫監視によって転移部位での増殖を抑制することができる:3)免疫応答及び認識の多 様性は腫瘍細胞によって用いられる異なる耐性機構を補償することができる:4)細胞傷 害性T細胞のクローン性増殖が増殖する腫瘍よりも迅速に起こり得、その結果として最終 的に腫瘍を征圧する抗腫瘍機構が生じる;及び5) 記憶応答が、物理的な検出の前に、疾 恩の再発をその最初期段階で抑制することができる。応答を示す患者の臨床的研究は、成 助する免疫療法が、CD4+T細胞、マクロファージ、及びNK細胞の関係について証拠 10 が存在するものの、CD8+T細胞(クラスI庇答)の活性化を含むことを示す動物モデ ·ルからの結果を支持している。例えば、Chapoval et al. . 1998. I Immunol, 161:6977-6984; Gollub et al., 19 98. I. Clin. Invest. 102:561-575:Kikuchi e t al., 1999, Int. J. Cancer 80:, 425-430: Pan et al., 1995, Int. J. Cancer 80:425-430:Sa ffran et al., 1998, Cancer Gene Ther, 5:321 -330;及びZimmermann et al., 1999, Eur. J. Imm uno1. 29:284-290を参照のこと。 [0006] 20

2、2. サイトカインの腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリー

 $TNF - \gamma$ ミリーの最も特徴付けられたメンバーは $TNF - \alpha$ である。 $TNF - \alpha$ は気疣 系に対して多面的な効果を発達することが知られている。 $TNF - \alpha$ は騒影細胞に対して 徒力な細胞傷害性効果を直接発揮することができるサイトカインである。 $TNF - \alpha$ は、一般には、他の機構、例えば、増進及び分化の刺散、並びに単珠におけるアポトーシスの助止(例えば、Mangan et al., 1991, J. Immunol. 146:1541-1546;及びOstensen et al. 1987, J. Immunol. 138:4185-41918を解則、東終的には腰橋内での血酔形成につながる、組織因子様疑血原活性の促進及び内皮細胞表面洗燥症活性の抑制(Beutler and Cerami, 1989, Ann. Rev. Immunol. 7:625-655;及びVassalli, P., 1992. Ann, Rev. Immunol. 10:411-452においてレビューされている)。しかしながら、これらの特性の結果として、汎発性血管内凝血のため、 $TNF - \alpha$ の全身投与は宿主に致命的な結果を生じる、

[0007]

値のサイトカインも抗腫瘍応答に関連付けられている。 IL - 2 はクラス i サイトカインであり、やはり抗腫瘍応答において役割を果たすものと考えられている。例えば、自発的に退行する黒色腫はTNF-α及びI-L-2 の腫瘍内レベルの上昇に関連付けられている。例えば、Бецt i er and Cerami, 1989, Annu, Rev. Immunol. 7:625-655; Lowes et al., 1997, J. In 40 vest. Dermatoi. 108:914-919; Mangan et al., 1991, J. Immunol. 146:1541-1546; Scheruich et al., 1987, J. Immunol. 138:1786-1790を参照のこと。

[0008]

TNF-a及びIL-2の両者はリンパ球の帰義(homing)を助け、IL-2はナチュラルキラー(NK) 細胞、T-細胞、及びリンホカイン钴性化キラー(IAK) 細胞の腫瘍浸潤を誘発することが示されている(例えば、Etter et al., 1998, Cytokine 10:395-403; Reinhardt et al., 1997. I.

30

Neuropathol. Exp. Neurol. 56:541-50:Voraet al., 1996, Clin. Exp. Immunol. 105:155-62;Luscinskaseetal., 1996, J. Immunol. 157:326-35;Kjaergaardetal., 1998, Scand. J. Immunol. 47, 532-540:Johansson et al., 1996, Nat. Immunol. 15;87-97;及びWatanabeetal.. 1996, Nat. Immun. 15:87-97;及びWatanabeetal.. 1997, Am. J. Pathol. 150:1869-80を診断り、TNF-a及びIL-2の阿著の存在下においては、TNF非感受性細胞株に向けられたとまでさえ、NK及びLAK細胞の細胞溶解治性が増加する(例えば、Ostensenetal. 1987, J. Immunol. 138:4185-4191を診断)。しかし 10ながら、IL-2の治療用レベルは結主に対して毒性であることも示されている。[0009]

明らかに、全身サイトカイン投与に超因する用量制限性の毒性は癌治療におけるサイトカ インの潜在能力の実現に重大な障壁を突きつける。さらに、全身性のサイトカイン送達は 、望ましくない臨床的副作用に加えて、同系了細胞の帰巣の減少を生じ、したがって、標 的免疫治療に対立することがある。Addison et al., 1998. Gene Ther. 5:1400-1409; Albertini et al., 1997, Clin. Cancer Res. 3:1277-1288; Becker et al 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7826 -7831; Book et al., 1998, J. Neuroimmunol. 9 20 2:50-59; Cao et al., 1998, I. Cancer Res. Cl in. Oncol. 124:88-92; D'Angelica et al., 19 99. Cancer Immunol, Immunother, 47;265-271 Deszo et al., 1996. Clin. Cancer Res. 2:15 43-1552; Kjaergaard et al., 1998, Scand, J. Immunol, 47:532-540; Ostensen et al., 1987. J. Immunol, 138:4185-4191:及FSchirrmacher et al., 1998, Clin. Cancer Res. 4:2635-2645 を参照のこと。

2. 3. サイトカインの送達

[0010]

近年の実験的動物及び能床研究では、サイトカインの亜全身性(gub-systemic)又は代替送達方法により、サイトカインの全身毒性を回避し、かつより高用量を投資する結成がなされている。ネズミモデルにおいては、映画合りポリーム封入TNF-aの会身投写での限り、及び短電券が治療されている(Tsutsumietal・1996、Jpn. J. Cancer Res. 87:1078-1085を参解)。内庭早球活性化ポリペプチドIIによるTNF-aに対する趣像の感作も報告されている(muryinetal・1995、J. Surg. Res. 63:248-255;Wuetal・1996、Cancer Res. 59:205-212)。[0011]

臨床研究において、インターフェロシー α 又はメルファランと組み合わせた隔離肢産灌(与の後、完全な腫瘍の機動が観察されている。しかしながら、この技術は、治療の後にサイトカインが完全に除去されない場合、患者に重大な危険をもたらす。さらに、これらの治療は肢隔離を必要とし、これはそれ自体が患者に危険をもたらす。さらに、これらのは et al., 1997、 Semin. Oncol. 24:547-555 Fraker et al., 1995、Cancer J. Sci. Am. 1:122-130; Lejeune et al., 1998、Curr. Opin, Immunol. 10:573-580: Marvin et al., 1996、J. Sarg.

Res. 63:248-255:Mizuguchi et al., 1998, Ca acer Res. 58:5725-5730:Tsutsumi et al., 19 96, Jpn. J. Cancer Res. 87:1078-1085:及びWu e t al., 1996, Cancer Res. 59, 205-212を参照のこと。 [0012]

Carrier et al., 1992, J. Immunol. 148:1176-R 81、Saltzman et al., 1997, Cancer Biother. R adiopharm, 12:37-45、Saltzman et al., 1997, Cancer Biother. R adiopharm, 12:37-45、Saltzman et al., 1997, J. Pediat. Surgery 32:301-306による従来の研究では、I $L-1\beta$ (Carrier) 及びIL-2 (Saltzman) を自然の中ルモネラの歌中10 設定である肝臓及び脚臓に直接送過ぎセでワクチン株としての役割を設すか、又は肝臓転移にである肝臓及び脚臓に直接送過ぎセでワクチン株としての役割を設すか、又は肝臓転移にであるに影響化アルモネラ枠の使用が執合されている。Saltzmanの研究ではサルモネラやのでは調査はGALで、陽時候トンバ精組織(gut associated lymphoid tissue)によって取り込まれ、肝臓及び脚脈に輸送される。しかしながら、これらの感染は自然の感染部位に限定される。

【0013】 2.4、血管新生及び腫瘍形成

機を治療するための別の方歳は血管新生の阻害を含む。血管新生は既存の血管からの新規 毛細血管の増殖のプロセスである。新規毛細血管は、既存血管の内皮細胞が、マトリック 20 ス・メタロプロテアーゼのようなタンパク分解酵素を用いて、それらの近傍の基底膜を分解し、特権では、周囲問題組織内に移動らせ、微小管を形成するプロセスによって形成される。この直衝新生のプロセスは負別で近の因子の用では、でまって非常に緩密に調節されており、成人においては、過常女性の生殖周期及び側側の修復に関定される(Malone et al., 1999、Clin. Bxp. Metastasis 17:1-14)。血管新生の異素調節が、機解外性稠膜底、乾燥、関切シューマチ、心血管病、及び腫瘍形成を含む多くのヒト隆害に関連付けられている(Folkman, 1995、Nat. Med. 1;27-31)。

[0014] 血管新生は腫瘍の成長及び転移にとって最も重要なプロセスである。腫瘍の形成は2つの 20 段階、南血管及び血管段階に分けられる。南血管腫瘍の細胞が血管新生化腫瘍に由来する 細胞と同程度に迅速に増殖することが研究によって示されている。しかしながら、南血管腫瘍が2−3mm⁸ を上回るまで増殖することはほとんどなく、これは細胞増殖と細胞でとの間に平衡が存在するためであり、後者は南血管腫瘍の健康業性から生じるものである(Folkman、1995、Nat. Med. 1:27−31)。南血管から血管 後際へ切り替えには、角の因子が緩勢である正味のパランスから正の因子、例えば、段の因子が緩外である正味のパランスから正の因子、例えば、角の因子のであるでは、角の因子のであるのでは、1998、Prog. Mol. Sabcell、 Biol. 20:161-176)。関節因子のパランスの移動と必要とする(Cao. 1998、Prog. Mol. Sabcell、 Biol. 20:161-176)。関節因子側のパランスの移動と必要とする(Cao. 1998、Prog. Mol. Sabcell、Biol. 20:166-1769。

2. 5. 抗血管新生因子

[0015]

尿発腫集がそれらの転移物の増殖をしばしば阻害する結果につながる幾つかの間連する現象に基づいて、抗血管新生因子が存在するものと仮定された(Cao,1998, Prog・ Mo!・ Subcel!・ Bio!・ 2;161-176)。 号継されるべきこれらの因子のうちの第1のものはマウス・アンギオスタチン、原発Lewis 肺底腫 腫瘍によって循環中に放出され、二次転移物の増殖を防止するプラスミノーゲンの38kDaタンパク分解性断片であった(Ο'Reii1yet a1.

1 79:315-328)。ヒトにおいては、メクロエラスターゼでのブラスミノーゲ ンの制限タンパク分解によって産生される40、42及び45kDaのペプチドがマウス ・アンギオスタチンに匹敵する抗血管新生活性を有する (O'Reilly et al. 1994. Cell 79:315-328)。プラスミノーゲンそれ自体はそのよ うな活性を持たない。腫瘍細胞それ自体は検出可能なアンギオスタチンmRNAを持たな いため、腫瘍関連マクロファージがアンギオスタチンの産生の原因であることも考えられ る。マクロファージのメタロエラスターゼの発現は、腫瘍細胞によって分泌される顆粒球 コロニー刺激因子 (GM-CSF) によって誘導される (Dong et al., 19 97. Cell 83:801-810)。特定の臘瘍においては、アンギオスクチン産 生はメタロエラスターゼではなくセリンプロテアーゼによって無媒され、セリンプロテア 10 ーゼは腫瘍細胞によって直接産生される(Gately et al., 1997, Ca ncer Res. 56:4887-4890)。原発腫瘍を有する実験マウスにアンギ オスタチンを100mg/kg/日の濃度で投与することで、毒性副作用なしに腫瘍増殖 の強力な阻害が生じた。このアンギオスタチン処置の中止の2週間以内に隨塞が再増殖し 、この処置の結果として腫瘍は完全に死ぬのではなく休眠状態に退行することが示される (O' Reilly et al., 1996, Nat. Med. 2:689-692) 。 [0016]

アンギオスタチンの発見後、幾つかの血管新生阻害性ペプチドを含む他の血管新生阻害物 質が発見され、単離された。アンギオスタチンよりも強力な血管新生の阻害物質はクリン 20 グル5 (kringle 5)、プラスミノーゲンの第5クリングル・ドメインを含むべ プチドである (アンギオスタチンはクリングル・ドメイン1-4を含む)。クリングル5 はプラスミノーゲンのタンパク分解によって産生することができ、組換え形態も活性であ % (Cao et al., 1997, I. Biol. Chem. 272:2292 4 - 22928)

[0017]

エンドスタチンはアンギオスタチンの単離に類似する方法で単離され(0'Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20)、その源はLewis肺癌腫で はなくネズミ血管内皮腫であった。このペプチドは20kDaの見かけの分子量を有し、 その配列はコラーゲンXVIII、様々なコラーゲン分子の間で開散しているNCIと呼 39 ばれる領域 (Oh et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sc i. USA 91:4229-4233:及FRehn et al., 1994, Pr oc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4234-4238) のC末端 に相当する (O' Reilly et al., 1997, Cell 88:1-20) 。マウスにおいて、Lewis肺癌腫転移物の増殖が0、3mg/kg/目の細格えエン ドスタチンを投与することによって抑制され、このペプチドを20mg/kg/目で投与 したときには原発腫瘍が休眠状襲に退行する。機能的組換えエンドスクチンは對人体から 、in vitroでの変性及び再折り畳みにより、又はin vivoでの皮下投与され たエンドスタチン封入体製剤の持続性放出により、産生させることができる(0) Rel | ly et al., 1997, Cell 88:1-20)。エンドスタチン発現プ * ラスミドを筋肉内投与することからなるエンドスタチン送達の代替法は、マウスモデル系 において、腫瘍増殖の部分的阻害のみを生じる (Blezinger et al., 1 999, Nat. Biotech. 17:343-348)。同様に、静脈内送達さ れた、リポソームに複合体化されたエンドスタチン又はアンギオテンシン・エンコーディ ングプラスミドは、乳癌のヌードマウスモデルにおいて、腫瘍増殖の部分的阻害を生じた (Chen et al., 1999, Cancer Res. 59:3308-331 2) . [0018]

近年、新規抗血管新生活性がSerpin(セリンプロテアーゼ阻害物質)抗トロンビン のC末端切断ペプチドに帰されている (O' Reilly et al., 1999, S 50 cience 285:1926-1925)。完全長抗トロンビンには固有の抗血管新生活性はないが、トロンビンによるそのタンパク質のC末端反応性ループの関裂により、 抗トロンビンは除力な血管新生活性を獲得する。以下、このタンパク分解断片を抗血管新生性抗トロンビンと呼ぶ。

[0019]

当該技術分野において公知の傭の血管新生園書性ペプチドにはフィブロネクチンの29k Da N末編及び40kDa C末編タンパク分解断片(Homandberg et al ., 1985. J. Am. Pathol. 120:327-332);プロラクチンの16kDaタンパク分解断片(Clapp et al., 1993, Endocr inology 133;1292-1299):及び血小板第4因子の7.8kDaタ ンパク分解断片(Gupta et al., 1995. Proc. Natl. Aca d、Sci. USA 92:7799-7803)が含まれる。

・抗血管新生効果が示されている天然産生タンパク分解解片に加えて、公知の細胞外マトリックスタンパク質の語域に相当する幾つかの合成ペプナドが血管新生の出音における活体について評価されている会機能的内皮性含性物質、なかわち、血管が主阻害物質とあるで、とが示されている合成ペプチドには、血小板第4因子の断片に相当する13アミノ酸ペプチド(Maione et al., 1990。 Cancer Res. 51:2077-2083); コラーゲンIの断片に相当する137ミノ酸ペプチド(Moine et al., 1993。 House et al., 1993。 J. Cell Biol. 122:497-511); トロンボ 20 スポンジンIの断片に相当する19アミノ酸ペプチド(Tolsmaet al., 1993。 J. Cell Biol. 122:497-511); 及び、ヒト黒色腫瘍胞における発現がin vifroでの悪地浸透の減少及びin vivoヌードウスモデルにおける発現がin vifroでの悪地浸透の減少をびin vivoヌードウスモギルにおける短標等成的の減少につながる分泌性のシステインに富む細胞外マトリックス精タンパク質である(Leddaet al., 1996、Nature Med. 3:171-176) SPARCの断片に相当する20アミノ酸ペプチド(Sage et al., 1995, J. Cell. Biochem. 57:1329-1334)が含ままれる。

[0021]

血管新生を阻害し、かつラミニン、フィブロネクチン、ブロコラーゲン、及びEGFの鮨 50 片に相当する10アミノ酸未満の他のペプチドも記載されている(Cao, 1998、 Prog. Mol. Subceil, Biol. 20:161-176 による総説 を参照)。

[0 0 2 2]

血管新生を阻害するハフィブロネクチンペプチドは、一般に、モチーフRGDを含む。RGDはインテグリン分子の認識とそれに結合するためにタンパク質によって用いられるペデチドモチーフ(下ミノ酸Arg-G「リーAsp)である。インチグリンα・身,の恐期する(Brooksetal・,1994、Science 264:569-571)。これは、RGDモチーフを含む環状ベンタベプチドの投資がビトロネラン委会の信息のインテグリンの活性を阻害し、網膜の血管新生を遮断することを示す研究によって結らなインチグリンの活性を阻害し、網膜の血管新生を遮断することを示す研究によって結らなイントグリンの活性を阻害し、網膜の血管新生を遮断することを示す研究によって結らとこう。2529-533)。インテグリン・ブロッカー、例えば、環状ベンタペプチド及びモノクローナル抗体の抗血管新生効果は、血管新生性血管のアポトーシスを誘導することにより脂集の退行を促進することが示されている(Brooksetal・1994、Cel1~7?1157~1164)。RGDモチーフ、及び他のインテグリン結合性モチーフNGR(アミノ酸Asn-GIn-Arg)を含むペプチドは顕著に強化された抗関熱

[0023]

別のタイプの細胞表面受容体、すなわち、ウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター 59

(aPA) 受容体の活性の間書も血管新生の阻素を生じる。 PA 受容体は、リガンドの 結合により、血管新生の基成機能測工程に必要なタンパケ分解カスケードを開始する。受容体プンタゴニストによる aPA 受容体の固容は血管が生、腫瘍増殖(Min. et al., 1996. Cancer Res. 56:2428-2433) 及び転移(Cr Owley et al., 1993. Proc. Natl. Acad. Sci, USA 90:502]-5025) を阻害する。そのようなアンタゴニストは無体高ペプチドのパタテリオファージ・ペプチド表示によって同定されている(Goodsonetal., Proc. Natl. Acad. Sci, USA 91:7129-7133)。受容体のリガンド、uPAの優性ネガティブ形態も同定されている(Min et al., 1996, Cancer Res. 56:2428-2433)。「6024]

アンギオスタチン、エンドスタチン及び他の抗血管新生ペプテドの発見は転治療の別緒的な新規アプローチをもたらしたものの、これらのペプナドを1つ以上を含む治療課程の実態は、ペプチドの大量産生の非視実性(65kg、すなわち1431bの平均的な人物について、ペプチドによっては毎日約1.3又は6.5グラムのタンパク質を生成する対策しついて、ペプチドによっては毎日約1.3又は6.5グラムのタンパク質を生成する対策しついて、ペプチドによっては毎日約1.3又は6.5分ラムタンパク質を生成する対策に合めるにはなける対策した。なければならないのある。これらのペプチドをそのよう第二級ではならないのある。これらのペプチドをそのよ、第2に、分解を免れた分子のうち、非常に限定された部分のみが腫瘍まで、1分別で、抗血管部に使われた分子の方ち、非常に限定された部分のみが腫瘍まで、カリオ関が高くて患者に優しい方法で、4次でチドをよが含れば、風器各級の分野にとって非常に利度がある。

[0025]

6. バクテリオシン・ファミリー

コリシンE3(以下、Co1E3と呼ぶ)はバクテリオシン、すなわち、選択的活性を有するパクテリアタンパク質性物薬であり、その宿主はその毒薬に対して免疫される。テリオシンは宿主ゲノム又はプラスミドによってコードされ得、近純な、もしくは狭い範囲の宿主を有することができ、かつ1つもしくは2つのサブユニットを含む単純精造又は多サブユニット構造を有することができる。(Konisky、1982。Ann.Rev、Microbio1、36:125—144)。加えて、パクテリオシン宿主はパラリオシンに対する免疫を有する。この免疫は、パクテリオシンを発現しないとして30、所定の信息集団の全ての環輸において見いだされる。

[0026]

その天然形態において、CoJB 3は1:1比の50kDa及伊10kDaタンパク質からなる60kDaタンパク質数合体であり、大きいサプユニットはスクレアービ活性を有し、小さいサプユニットは50kDaサプユニットの阻害機能を有する。したがって、50kDaタンパク質は細胞傷害性タンパク質(すなわち、概素)として作用し、10kDaタンパク質(技術等茶して作用する、50kDaサプユニットは少女くとも2つの機能 ダ

40

的ドメイン、標的細胞膜を模切っての転位に必要なN末端領域、及び触線 (RNA分解酵素) 活性を有するC未端領域を含む。宿主生物内で、大サブユニットの結性は小サブユニットによって阻害される。これらのサブユニットは、その毒素が組め細胞内に負人したときに、繰的細胞の外膜との相互作用の結果として解離するものと考えられる(Konisky、1982、Ann、Rev、Microbiol、36:125-144による総額)。

[0028]

ColE3の大サブユニットの套性は微生物のうちでのクローン化遺伝子の外側拡散の防止に利用されている。Diazら(1994、Mol、Microbiol、13: 51918 61) は、ColE3のたれら2つの成分を、小(抗毒性) サブユニットが乗 20 色体に統合されたコーディング配列として発現し、大サブユニットがプラスミドから発現されるように分離した。楽色像に組み込まれたハサブユニットを育する細菌はColE3大サブユニットを発現するブラスミドがはして免疫されているが、そのブラスミドがフェストントラスシートを入り、アサブエニットを発現するブラスミドに対して発疫されているが、その70万スミドが大力でスティントラスミドがよりと変しまります。

[0 0 2 9]

コリシンE3(ColE3)は、白血病補助モデル系(Fiska et al.. 1979. Bxperimentia 35;406-407を参照)を含む哺乳動物細胞に対する大きな細胞構合性効果を有することも示されている(Smarda, et al.. 1978. Folia Microbiol. 23:272-277を参照)。Co201E3の活性は80S哺乳動物リボソームの40Sサブユニットを繰的とする(Tumowsky et al.. 1973. Biochem. Biophys. Res. Comm. 52:327-334)。[0030]

2、7、細菌の感染及び癌

初期の臨床翻察で、細菌が膨発した患者においてある種の癌が退行することが報告された を倒が緩告された。Nauts et al. 1953、Acta Medica、Scandinavica 145:1-102、(Suppl. 276) 元 205 he ar. 1950、J. A. M. A. 142:383-390を参照のこと。これらの観察以来、Lee et al., 1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1847-1851 (Leeら)及びJones et al., 1992、Infect. Immun. 60:2475-2480 (Jones ら)は、in vitroで野生型株よりもかなり多くの数がHBp-2 (ヒト頻表皮感層) 細胞に浸潤し得るサルモネラ菌 (Salmonella typhimurium)の突然変異体を単熔した。これらの「過剰浸潤性(トリerinvasive)」突然変異体は、HBp-2動物細胞に浸潤する野生型株の能力を通常は抑制する細菌の好気性増縮の条件下で草雕した。しかしながら、Leeら及びJonesらによって記載されるような過剰浸潤性サルモネラ菌には1000を1000であるい。

[0031]

Carswell et al., 1975, Proc. Natl. Acad. Sc. U.SA 72:3666-3669は、ウシ型調整結核菌ワクチン(bacillus Calmette-Guerin) (BCG)を注射したマウスでTNFの血清濃度が増加し、TNF陽性血清がマウスにおいて内腫Meth A及び他の移植態圏の現形を生じたことを示した。このような額容の結果として、BCG柱針での動態者の発化が現在幾つかの動治者の分配するいでは、Sosnowski、1994、Compr. Ther. 20:695-701:Barthand Morton, 1995, Cancer 75 (Suppl. 2):726-734;Friberg, 1993, Med. Oncol, Tumor, Pharmacother, 10:31-36を参照のこと。

[0032]

2、8. 腫瘍標的細菌

[0034]

遺伝子操作されたサルモネラが、腫瘍を繰的とすることが可能であり、抗腫療活性を有し、かつ固形態勢へのエフェクター違伝子、例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ(HS V TK)の送達において有用であることが示されている(Pawelek et al. WO 96/40238)。

2.9. 改変細菌リビドAによるTNF-cの誘導の減少

TNF。産生の誘導が減少する結果として免疫応答を変化させる腫瘍標的調菌の脂質組成を改変することがPawelekら(Paweleketal. WO 96/402 38)によって示唆された。Paweleketekら、ナイスホリルリピドA(MLA)産生の責を負うロードパクター(Rhodobacter)から遺伝子を単離するための方を接を提供した。MLAは散血症性ショックのアンタゴニストとして作用する。また、Pawelekらは、リピドA生合成における第38第UDP-3-O(R-30とドロキシルミリストイル)ーグルコサミンーアシルトランスフェラーゼをコードする突然変異firA(Kelley et al. 1993、J. Biol. Chem。268:19866-19874)を含む、リピドA生合成経路における違伝子的改変の使用を提案した。Pawelekらは、firA違伝子における突然変異が低レベルのTNFaを誘導することを示した。

[0035]

大騎商 (Escherichia coli) において、リピドAの末端ミリスチル化の原因である遺伝子msbB (mlt) が同定されている (Engel, et al., 1992. J. Bacteriol. 174:6394-6403; Karow and Georgopoulos 1992. J. Bacterial. 174:702-710; Somerville et al., 1996. J. Clin. Invest. 97:359-365)。この遺伝子の遺伝子的酸環は安定な無条件的突然変異を生じ、これはTNF 4の誘導を低下させる (Somerville et al., 1996. J. Clin. Invest. 97:359-365; Somerville, WO 97/25061)。しかしながら、これらの参考文献は、通過折的サルモネラペクターにおけるmsb B遺伝子の破験が、釈明性が低く、かつキレート別に対してより感受性である細菌を生じるであるうことを示唆してはいない。

M面を違伝子送達ベクターとして用いることに関連する問題は、正常精乳動物細胞を直接 鞭す細菌の一般的な能力に加えて、宿主にとって毒性の結果を有するTNFαを介して免 寝系を過剰潮減するそれらの能力に集中している(Bone,1992, JAMA 2

寝系を過剰刺激するそれらの能力に集中している(Bone, 1992, JAMA 2 68:3452-3455; 及びDinarello et a1. 1993, JAMA A 269:1829-1885)。これらの要薬に加えて、抗生物質に対する耐性は、 ヒト体内での細菌の存在との対処を非常に複雑にする可能性がある(Tschape, 1996, DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr 1996 103:273-7: Ramos et a1., 1996, Bnferm Infec , Microbiol, Clin. 14:345-51)。

[0037]

Hone and Powell, W097/18837 ([Hone及UPowell])は、非発熱性リビドA又はLPSを有するグラム酸性細菌を産生する方法を開示してい 200

[0038]

Maskell、W098/33923は、TNFaを野生型株と比較して低レベルで誘 導するmsbB遺伝子内の突然変異を有するサルモネラの突然変異株を記載している。 [0039]

Bermudesら、WO 99/13053は、サルモネラにおけるmsbB遺伝子を 遺伝子的に破壊するための組成物及び方法を教示し、これは、野生型と比較してTNFa を誘発する能力に劣り、かつ病原性が低いサルモネラを生じる。ある種の競技においては 10 、幾つかのそのような突然変異体サルモネラは野生類サルモネラと比較してキレート訓に 対する感受性を高めた。Low et al., 1999, Nature Biotec h. 17:37-47も参照のこと、

[0 0 4 0]

セクション 2 又は本願のあらゆるセクションにおけるあらゆる参考文献の引用又は同定は 、そのような参考文献が本発明に対する従来技術として利用可能であることを承認するも のであると解釈されるべきではない。

[0041] 3. 発明の概要

本発明は、閻彩腫瘍に1つ以上の一次エフェクター分子を送達する方法を提供する。一つ 20 の実施形態において、この方法は高レベルの1つ以上の一次エフェクター分子の決策を提 供する。特に、本発明は、宿主に全身役与した場合には無性であるか望ましくない作用(例えば、望ましくない免疫作用)を誘導しうる一次エフェクター分子を、宿主への毒性を 低下させたサルモネラ(Sa1monella)のような弱毒化腫瘍標的細菌によって腫 憑に局所送達する方法を提供する。本祭明は、1つ以上の一次エフェクター分子および場 合により1つ以上の二次エフェクター分子を、適当な作用部位 (例えば、固形腫瘍部位) に送達するためのベクターとしての弱毒化腫瘍標的細菌 (例えば、サルモネラ) の作製な らびに使用を包含する。詳細には、本発明の影響化腫瘍標的細菌は、1 つ以上の一次エフ エクター分子および場合により1つ以上の二次エフェクター分子をコードするように遺伝 子操作された通性好気性菌または通性嫌気性菌である。

[0 0 4 2]

本発明は、國形腫瘍の部位で一次エフェクター分子をコードする技能分子を発現するよう に遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。特定の実施形態において、弱毒化腫 瘍標的細菌は1つの一次エフェクター分子をコードする核酸分子を発現するように遺伝子 操作される。別の実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は1つ以上の一次エフェクター分子 をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施影態に従 うと、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1 つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施形態においては、2つ以 上の弱毒化膿瘍標的細菌株が1つ以上の一次エフェクター分子をコードする1つ以上の核 酸分子を発現するように遺伝子操作される。この実施形態の様式では、弱毒化腫瘍標的細 40 菌株が同一の種のものである。この実施形態の別の様式では、弱毒化腫瘍標的細菌株が具 なる種(倒えば、リステリア属とサルモネラ属)のものである。

[0043]

本発明の一次エフェクター分子は癌腫、黒色腫、リンバ腫、肉腫などの固形腫瘍癌を治療 するのに有用である。本明細書中で用いる「固形腫瘍の治療」または「固形腫瘍を治療す る」とは、腫瘍もしくは腫瘍細胞の増殖を阻害すること、腫瘍の体精を縮小すること、腫 瘍細胞を殺すこと、または腫瘍細胞の広がり(転移)を防止することを包含する。特定の 実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍部位で局所免疫応答を引き出し て、結果的に腫瘍もしくは腫瘍細胞の増殖を阻害し、腫瘍細胞を死滅させ、または腫瘍細 胞の他の身体部分への転移を防止する。したがって、一次エフェクター分子は腫瘍治療効 50 果をもたらす。

[0044]

一次エフェクター分子は、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルスを含むがこれら に限らない、あらゆる既知の生物から誘導することができる。本発明の一実施形態の好ま しい様式において、一次エフェクター分子は哺乳動物に由来するものである。この実施形 態のより好ましい様式では、一次エフェクター分子はヒト由来のものである。本発明の一 次エフェクター分子としては、TNFファミリーのメンバー、抗血管新生因子、細胞傷害 性ポリペプチドもしくはペプチド、腫瘍阻害酸素、およびこれらの機能性断片が挙げられ 200

[0045]

特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子はTNFファミリーのメンバー またはその機能性断片である。TNFファミリーのメンバーの例として、制限するもので はないが、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、腫瘍壊死因子 β (TNF- β)、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF-a関連活性化により誘導され るサイトカイン(TRANCE)、TNF-α関連の弱いアポトーシス誘導物質(TWE AK) 、CD40リガンド (CD40L) 、LT-α (リンホトキシンα) 、LT-β (リンホトキシンβ)、OX40L (OX40リガンド)、FasL、CD27L (CD2 7リガンド)、CD30L (CD30リガンド)、4-1BBL、APRIL (増殖誘導 性リガンド)、LIGHT(活性化T細胞により産生される29kDaタイプII膜貫通 タンパク質)、TL1(腫瘍壊死因子様サイトカイン)、TNFSF16、TNFSF1 7、およびAITR-L (活性化により誘導されるTNFRファミリーのメンバーのリガ ンド)がある。好ましい実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍壊死因 子a(TNF-a)、腫瘍壊死因子a(TNF-a)、TNF-a関連アポトーシス経業 性リガンド (TRAIL)、TNF- a 関連活性化により誘導されるサイトカイン (TR ANCE)、TNF-a関連の弱いアポトーシス誘導物質(TWEAK)、およびCD4 0リガンド (CD40L)、またはこれらの機能性断片である。

[9046]

別の特定の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は抗血管新生因子またはその機 能性断片である。抗血管新生因子の例として、制障するものではないが、エンドスタチン 、アンギオスタチン、抗血管新生アンチトロンビンIII、フィブロネクチンの29kD 30 a N末端および40kDa C末端タンパク電分解断片、nPA受容体アンタゴニスト。 プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8kDaタンパク 質分解断片、血小板第4因子の銃血管新生24アミノ酸断片、13.40と称する抗血管 新生因子、トロンボスポンジンIの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの 抗血管新生20アミノ酸ペプチド断片、RGDおよびNGRを含むペプチド、ラミニン、 フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新生ペプチド、ならび にインテグリンα、β。およびVEGF受容体のペプチドアンタゴニストがある。本祭明 の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子はエンドスタチン、アポミグレ ンまたはトロンポスポンジン!の機能性断片である。

[0047]

別の特定の実施形態において、本発明の一次エフェクター分子は細胞傷害性ポリペプチド もしくはペプチド、またはその機能性断片である。細胞傷害性ポリペプチドもしくはペプ チドの例として、制限するものではないが、バクテリオシンファミリーのメンバー、ベロ 毒素、細胞傷害性壊死因子1 (CNF1) 、細胞傷害性壊死因子2 (CNF2) 、 Pas teurella multiocida毒素 (PMT), Pseudomonas内毒 素、ヘモリシン、ファルネシルトランスフェラーゼの強力な競合阻害剤であるCAAXテ トラベプチド、サイクリン阻害剤、Rafキナーゼ阻害剤、CDCキナーゼ阻害剤、カス パーゼ、p53、p16およびp21がある。好ましい実施形態では、一次エフェクター 分子はバクテリオシンファミリーのメンバーであるが、ただし、バクテリオシンファミリ ーのメンバーはバクテリオシン放出タンバク質 (BRP) ではない。バクテリオシンファ 50 ミリーのメンバーの例として、制限するものではないが、CoIB1、CoIE2(CoIE3)、CoIE4、CoIE5、CoIE6、C

は V U ≈ 0.1 別の特定の実施影像において、本発明の一次エフェクター分子は腫瘍阻害膨棄またはその 機能性解片である。履態阻毒酵素の例として、制限するものではないが、メチオナーゼ、 アスパラオナーゼ、リバーゼ、オスホリバーゼ、プロテアーゼ、リボスクレアーゼ(c o 10 I E 3 を除く)、DNAアーゼ、およびグリコシダーゼがある。好ましい実施形態では、

一次エフェクター分子はメチオナーゼである。 「nn49]

100501

本発明の二次エフェクター分子は、追加の抗腫瘍治療活性をもたらし、弱毒化一次エフェクター分子に加えて、本発明の方法により透達されて棲的細菌からの一次エフェクター分 ラチの放出を促進し、そしてノまた、作用部位(例えば、國彩驅瘍の部位)でのた化を高める。本発明の二次エフェクター分子は、塩魔、黒色屋、リンパ腫、肉腫などの國形腫瘍癌を治療するために、一次エフェクター分子に加えて、本発明の方法により送達される分子(例えば、細胞毒素、酵素、パクテリオシンを含むがこれに限らない抗腫瘍タンパク質、ブロドラッグ変換酸素、アンチセンス分子、リボザイム、抗原など)からなる。

[0 0 5 1]

二次エフェクター分子は、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウイルスを含むがこれらに限らない、あらゆる既知の生物から肺端することができる。特定の実施影態において、二次エフェクター分子は個直またはウイルスに由来するものである。本発明のいくつかの好ましい実施影態では、二次エフェクター分子は細菌由来のもの(例えば、BRP)である。本発明の他の好ましい実施影態では、二次エフェクター分子はかイルス由来のもの(例えば、TAT)である。本発明の他の好ましい実施影響では、二次エフェクター分子は哺乳動物に由来するものである。いくつかの好ましい実施影響において、二次エフェクター分子は片まである。

[0052]

本発明は、ブラスミドまたほトランスフェクトしうる核酸によりコードされるエフェクター分子を含む肺毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明の好ましい実施を際において、弱差化膿瘍標的細菌はサルモネラである。2つ以上のエフェクター分子(何えば、一次または二次)が弱毒化腫瘍瘍的細菌(例えば、サルモネラ)において発現される場合、それらのスフェクター分子は同一ツブラスドドまたは核酸によりコードされても、2つ以上のブラ %

スミドまたは核酸によりコードされてもよい。本発明はまた、細菌ゲノムに組み込まれる 核酸によりコードされるエフェクター分子を含む弱寒化腫瘍標的細菌を提供する。組み込 まれるエフェクター分子は、弱毒化腫瘍標的細菌 (例えば、サルモネラ) に対して内因性 であってもよいし、また、(例えば、プラスミド、トランスフェクトしうる核酸、トラン スポゾンのような、エフェクター分子をコードする核酸の導入により、弱悪化腫瘍種的細 蕨に導入されてもよい。結果的に、エフェクター分子をコードする核酸が弱素化腫瘍緩的 細菌のゲノムに組み込まれるようにする。本発明は、適切なプロモーターに機能的に連結 されたエフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。エフェクター分子をコードす る核酸に機能的に連結されるプロモーターは、同種 (すなわち、天然) であっても異種 (すなわち、エフェクター分子をコードする核酸本来のものではない)であってもよい。適 10 当なプロモーターの例としては、制限するものではないが、Tetプロモーター、L:c , pepT, lac, salA, pol II (dinA), rav, recA, uvr B、uvrD、umuDC、lexA、cea、caa、recN、およびpagCが挙 げられる。

[0053]

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌によりシグナル配列とエフェクター分子からなる1つ 以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。好ましい実施形態において 、弱毒化腫瘍標的細菌は、Omn様タンパク管またはその一部(例えば、シグナル配列。 リーダー配列、周辺細胞質領域、膜貫通ドメイン、複数回膜貫通ドメイン、またはそれら の組合せ;「Omp様タンパク質」の定義については下記の第3、1節を参照のこと)お 20 よびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分 子を発現するように遺伝子操作される。作用機構に関して制限されるものではないが、本 発明は、Omp様タンパク質が外膜にエフェクター分子を固定もしくはつなぎ止める働き をしているか、細菌外膜にエフェクター分子を局在させるように働く、と考えられる。い くつかの実施形態において、エフェクター分子は細菌外膜への送達が増加される。ある実 施形態では、Omp様タンパク質にエフェクター分子を融合させることで、エフェクター 分子の周辺細胞質への周在が増加される。Omp様タンパク質の例として、制限するもの ではないが、Omp A、Omp B、Omp C、Omp D、Omp E、Omp F、Omp T 、ポーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、lamB、βーラクタマーゼ、エンテロ トキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ベブチドグリカン関連リポタンパク質 (30 PAL)、FepA、FhuA、NmpA、NmpB、NmpC、および主要外膜リポタ ンパク質 (例えば、LLP) のそれぞれの少なくとも一部が挙げられる。本発明の他の実 施彩態では、本発明の融合タンパク質はタンパク質分解切断部位を含む。このタンパク質 分解切断部位はエフェクター分子またはOmp様タンバク質に内因性のものであってよく 、あるいはタンパク質分解切断部位を融合タンパク質中に構築してもよい。

[0 0 5 4]

本発明はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にフェリーペプチドとエフェクター分 子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所送達するための方法を提供する。融合タンパ ク質中で用いるフェリーペプチドは、その生産または導入の拡散範囲内のほぼすべての細 胞への目的のポリペプチドまたはペプチドの送達を促進することが分かっている (例えば 40 Bayley, 1999. Nature Biotechnology 17: 10 66-1067; Fernandezb, 1998, Nature Biotechn ology 16: 418-420; Derossib, 1998, Trends C ell Biol. 8: 84-87を参照のこと)。したがって、フェリーペプチドと エフェクター分子からなる融合タンパク質を発現するように弱寒化腫瘍標的細菌を遺伝子 操作することは、腫瘍細胞に内在化されるエフェクター分子の能力を高める。特定の実施 形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はフェリーベブチドとエフェクター分子からなる1つの融 合タンパク質をコードする1つの核酸分子を発現するように遺伝子操作される。別の実施 形態では、弱毒化腫瘍標的細菌はフェリーベブチドとエフェクター分子からなる1つ以上 の融合タンパク質をコードする1つ以上の核密分子を発現するように遺伝子操作される。

これらの実施形態によれば、ユフェクター分子は一次または二次エフェクター分子であり うる。フェリーペプチドの側として、制腿するものではないが、HIV TATタンパケ 賃、アンテナペディアホメオドメイン(ペネトラキシン)、カポジ繊維等細胞増殖因子(FGF)膜移行性配列(MTS)、および単純ヘルペスウイルスVP22がある。 【0055】

本発明はまた、弱熱化腫瘍標的細菌により固彩腫瘍にシグナル配列とフェリーペプチドと エフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局所透達するための方法を提供す あ。特定の実施影態において、弱熱化腫瘍瘍的細菌は、シグナル配列とフェリーペプチド とエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子 を発現するように遺伝子操作される。この実施形態において、エフェクター分子は一次ま 10 なは二次エフェクター分子であわるみ。

【0056】 本発明はまた、弱壽化腫瘍標的細菌により固形腫瘍にシグナル配列、タンパク質分解切断 部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からなる1つ以上の融合タンパク質を局 所送達するための方法を提供する。特定の実施影繁において、弱壽化腫瘍繰的細菌は、シ ガナル配列、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよびエフェクター分子からな る1つ以上の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操 作される。この実施形態において、エフェクター分子は一次または二次エフェクター分子 であり3点。

[0057]
いくつかの実施形態では、1つの細菌株が固形腫瘍の部位で本発明の融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。いくつかの他の実施形態では、2つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作される。いくつかの他の実施形態では、2つ以上の核酸分子を発力を発現するように遺伝子操作される。これらの実施形態の様式において、弱毒化腫瘍標的細菌株は同一種のものである。これらの実施形態の様式において、弱毒化腫瘍標的細菌株は異なる種(例えば、リステリア属とサルモネラ病)のものである。

[0058] 本発明的はまた、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍の部位に本発明の1つ以上の融合タンパク質および本発明の1つ以上のエフェクター分子を局所送達するための方法を提供する 26 好手しくは、弱毒化腫瘍標的細菌により固形腫瘍の部位で融合タンパク質とエフェクター分子の両方が発現されると、融合タンパク質のみまたはエフェクター分子のみが発現される場合に比べて、腫瘍または腫瘍細胞の増殖の囲きたれるレベルが向上する。

[0 0 5 9] 本発明はまた、高められた放出系をもつサルモネラのような弱悪化腫瘍種的細菌における 一次エフェクター分子および場合により二次エフェクター分子の発現を提供する。本発明 の好ましい実施形態において、高められた放出は弱毒化腫瘍標的細菌による放出因子の発 現と関係する。一つの実施影響では、かかる放出により細胞質または細胞周辺腔からのエ フェクター分子の放出が増大する。放出因子は弱毒化腫瘍標的細菌に内因性のものであっ でも、外因性のもの(すなわち、弱毒化腫瘍標的細菌には本来存在しない核酸分子により 40 コードされるもの)であってもよい。放出因子はプラスミドからなる核酸によってコード されてもよいし、弱毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれる核酸によってコードされて もよい。放出因子は一次エフェクター分子をコードする核酸もしくはプラスミドと同じも の、または別個の核酸もしくはブラスミドでコードされ得る。放出因子は二次エフェクタ 一分子をコードする核酸もしくはプラスミドと同じもの、または別個の核酸もしくはプラ スミドでコードされ得る。好ましい実施形態において、放出因子はバクテリオシン放出タ ンパク質(BRP)である。特定の実施形態において、BRPはクロアシンDF13ブラ スミドのもの、コリシンE1~E9プラスミドのもの、またはコリシンA、NまたはDプ ラスミドのものである。好ましい実施形態では、BRPはクロアシンDF13のもの(p CloDF13 BRP)である。本祭明の別の実施形態では、高められた故出茶はボー

40

リンタンパク質の過剰発現を含む。

[0060]

本発開はまた、高められた放出系をもつサルモネラのような弱毒化腫瘍標的細菌における 本発明の融合ケンパク質の発現を提供する。特定の実施影態において、放出因子はOmp 様クンパク質に融合された−次エフェクター分子からなる融合タンパク質を完就する細胞 において発現される。この実施形態では、放出因子の共発現が細胞周辺軽からの融合タン バク質の放出を高める。

[0061]

[0063]

本発明の医薬組成物は固彩腫瘍の治療に有用である。固彩腫瘍には、肉腫、癌腫、リンパ 鹿、その鶴の固彩腫瘍癌(例えば、生殖瀬臨系の腫瘍、中枢神経系の腫瘍、乳癌、前立腺 ・患、子官薬癌、子官癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、グリオーム、膵 麻癌、胃癌、肝臓癌、大腸癌、黒色腫、腎軽癌、膀胱癌、中皮腫)が含まれるが、これら に関らない。

[0064]

* 本発明は、同形臓器衛の治療のために一次エフェクター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好きしくはほとトにフロレレの次次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱等化腫瘍疾的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。本発明はまた、同形臓響機の治療のために一次エフェクター分子を造成する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくは上、この以上の一次エフックター分子あよび1つ以上の二次エ四チの子の子分子を一次する一下する10以上の核酸分子を含むように違伝子操作された場番化機構像的細菌を含有する医薬組成物を投与することを含んでなる。本発明はまた、固彩腫瘍機の治療のために一次エフェクター分子を送りまった法を機能し、この方法は、そのような治療が必要な動物、代ましくは 50

哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の本発明の融合タンパク質をコードする1つ 以上の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的鋼菌を含有する医薬組成物 を投与することを含んでなる。さらに、本発明は、固形腫瘍癌の治療のために一次エフェ クター分子を送達する方法を提供し、この方法は、そのような治療が必要な動物、好まし くは哺乳動物、最も好ましくはヒトに、1つ以上の本祭明の融合タンパク質および1つ以 上のエフェクター分子(すなわち、一次および/または二次分子)をコードする1つ以上 の核酸分子を含むように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌を含有する医薬組成物を投 与することを含んでなる。好ましい実施形態において、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ である。特定の様式では、弱毒化脂瘍種的細菌が高められた放出系を含む。

[0065]

いくつかの実施形態においては、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパ ク質をコードする1つ以上の核酸分子を祭現するように遺伝子操作された弱悪化腫瘍操的 細菌は、他の公知の癌治療法と共に使用することができる。例えば、1つ以上のエフェク ター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の検験分子を登録するよう に遺伝子操作された弱毒化腫瘍膿的細菌は、化学療法剤と共に用いられる。化学療法剤の 例として、制限するものではないが、シスプラチン、イホスファミド(ifosfami de)、パクリタキソール、タキサン類、トポイソメラーゼI 風害剤 (例えば、CPT-11、トポテカン、9-AC、およびGG-211)、ゲムシタビン(geneitabine)、ピノレルピン(vinorelbine)、オキサリプラチン(oxalip latin)、5-フルオロウラシル (5-FU)、レウコボリン (leucovori 20 n)、ピノレルピン (vinorelbine)、テモダール (temodal)、タキ ソール、サイトカラシン(cytochalasin)B、グラミシジンD、エメチン、 ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルヒチン ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロ ン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、メルファラン 、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、 およびピューロマイシン同族体、ならびにサイトキサンが挙げられる。あるいはまた、1 つ以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分 子を発現するように遺伝子操作された弱毒化腫瘍標的細菌は、放射線療法と共に用いられ 80

[0066]

本発明は、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および/または融合タンバク質をコー ドする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作された弱寒化腫瘍標的細菌と、の 連続的または並行投与を含む。本発明は、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分子および /または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝子操作さ れた弱毒化腫瘍標的細菌と、の相加的または相乗的組合せを知念する。

本発明はまた、作用部位がそれぞれ異なっている、抗癌剤と、1つ以上のエフェクター分 子および/または融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように遺伝 子操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、の組合せを包含する。そのような組合せは、その組 40 合せが相加的であろうと相乗的であろうと、これらの治療薬の二重作用に基づく向上した 治療を提供する。したがって、本発明の新規組合せ療法は、単一薬剤療法として用いられ るいずれか一方の薬剤と比べて、向上した効力をもたらす。 [0068]

3.1. 定義と略語

本駒細書で用いる用語「サルモネラ」とは、チフス菌、ブタコレラ菌、および腸炎菌等の すべてのサルモネラ種を包含する。また、例えば、腸炎菌の亜醇であり、一般にネズミナ フス菌 (Salmonella typhimuriam) と呼ばれる、ネズミチフス菌 等のサルモネラの血清型も含まれる。

[0 0 6 9]

類似体: 本明細書で用いる用語「類似体」は、一次または二次エフェクター分子として 類似または同一の機能を有するが、一次または二次エフェクター分子の類似または同一の アミノ酸配列を必ずしも含まない、あるいは、一次または二次エフェクター分子の類似ま たは同一の構造を必ずしも有していないポリペプチドを意味する。類似アミノ酸配列を含 むポリペプチドとは、下記事項の少なくとも1つを満たすポリペプチドを意味する:(a) 本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子のアミノ酸配列に対して少なくと も30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50% 、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも10%、少なく とも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95 %、または少なくとも99%同一であるアミノ藤配列を有するボリベブチド: (h) 少な 10 くとも5個連続したアミノ酸残基、少なくとも10個連続したアミノ酸残基、少なくとも 15個連続したアミノ酸残墓、少なくとも20個連続したアミノ酸発基、少なくとも25 個連続したアミノ酸残基、少なくとも40個連続したアミノ酸残基、少なくとも50個連 続したアミノ酸残基、少なくとも60個連続したアミノ酸残基、少なくとも70個連続し たアミノ酸残基、少なくとも80個連続したアミノ酸残基、少なくとも90個連続したア ミノ酸残基、少なくとも100個連続したアミノ酸残基、少なくとも125個連続したア ミノ酸残基、または少なくとも150個連続したアミノ酸残基の、本明細書に記載した― 次または二次エフェクター分子をコードするヌクレオチドに、ストリンジェントな条件下 で、ハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるポリペプチド: (c) 本 明細書に記載した一次または二次エフェクター分子をコードするヌクレオチドに対して少 20 なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも 50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、 少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくと も95%、または少なくとも99%間ーであるヌクレオチド配列によってコードされるポ リベプチド。本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似した構造を有す るポリペプチドとは、本明細書に記載した一次または二次エフェクター分子と類似した二 次、三次または四次構造を有するポリペプチドを意味する。ポリペプチドの構造は、当業 者には公知の方法により決定することができ、このような方法として、限定するものでは ないが、ペプチド配列決定、X級結晶検査、核磁気共鳴、円二色性、結晶電子顕微鏡検査 法が挙げられる。

[0070]

抗血管新生因子: 抗血管新生因子は、抗血管新生活性を育するタンパク質性分子、ある いは、このようなタンパク質性分子をコードする核酸である。好ましい実施形態では、抗 血管新生因子は、ペプチド断片、またはこれより大きいタンパク質の切断断片である。 100711

弱毒化! 弱毒化は、微生物またはベクターの病原性が弱まるような改変である。弱毒化 が目的とする結果は、上記様生物またはベクターを患者に投与したとき、毒性や他の副作 用等の危険性が低減することである。

[0072]

バクテリオシン: バクテリオシンは、細菌の宿主が毒素に対して免疫性であるという点 40 で、選択的活性を有する細菌タンパク質性毒素である。パクテリオシンは、細菌の宿主ゲ ノムまたはプラスミドによりコードされ、広いもしくは狭い範囲の他の細菌に対して毒性 であり、1つまたは2つのサブユニットからなる単純な構造であるか、あるいは、多サブ フニット構造である。さらに、パクテリオシンを発現する宿主は、該バクテリオシンに対 する免疫を有する。

[0 0 7 3]

キレート創感受性: キレート創感受性は、細菌の増殖が影響を受ける有効濃度として定 義されるか、または、回収可能なコロニー形成単位(c,f,u,)によって決定される ような、細菌の生存能が低下する濃度として定義される。

[0074]

誘導体: 本明細書において、「ポリベブチドの誘導体」という表現で用いる用語「誘導 体」とは、アミノ酸残基の置換、欠失もしくは付加の導入、またはあらゆるタイプの分子 のボリペプチドへの共有結合により、改変された一次または二次エフェクター分子のよう なポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドを意味する。本明細書において、『一 次または二次エフェクター分子の誘導体 | という表現で用いられる用語「誘導体」は、例 えば、あらゆるタイプの分子の上記一次または二次エフェクター分子への具有結合により 、そのように修飾された一次または二次エフェクター分子を意味する。例えば、限定する ものではないが、一次または二次エフェクター分子は、例えば、タンパク質分解切断、細 胞リガンドもしくはその他のタンパク質との連結等により、修飾することができる。一次 または二次エフェクター分子の誘導体は、当業者には公知の技法を用いた化学的修飾(例 10 えば、アシル化、リン酸化、カルボキシル化、グルコシル化、セレン修飾および硫酸化) により修飾することができる。さらに、一次または二次エフェクター分子の誘導体は、1 個以上の非古典的アミノ酸を含んでいてもよい。ポリペプチド誘導体は、本明細書に記載 した一次または二次エフェクター分子と類似または同一の機能を有する。本明細書におい で、「msbB"弱毒化腫瘍線的サルモネラ突然変異体の誘導体 | という妄現で用いる用 語『誘導体』は、国際公開番号WO 99/13053 (本明細書に、参照により全文が 組み込まれる)の第17頁に定義された修飾msbB゚ルモネラ突然変異体を意味する。 [0075]

断片: 本明細書で用いる用語「断片」とは、一次または二次エフェクター分子のアミノ 酸配列の少なくとも2個連続したアミノ酸残基、少なくとも5個連続したアミノ酸残基、 少なくとも10個連続したアミノ酸残基、少なくとも15個連続したアミノ酸残基、少な くとも20個連続したアミノ酸残基、少なくとも25個連続したアミノ酸残基、少なくと も40個連続したアミノ酸残基、少なくとも50個連続したアミノ酸残基、少なくとも6 0個連続したアミノ酸残基、少なくとも70個連続したアミノ酸残基、少なくとも80個 連続したアミノ酸残基、少なくとも90個連続したアミノ酸残基、少なくとも100個連 続したアミノ酸残基、少なくとも125個連続したアミノ酸残基、少なくとも150個連 続したアミノ酸残基の、少なくとも175個連続したアミノ酸残基の、少なくとも200 個連続したアミノ酸残基の、もしくは少なくとも250個連続したアミノ酸残基の、アミ ノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを意味する。

[0 0 7 6]

機能性断片: 本明細書で用いる用語「機能性断片」とは、上記一次または二次エフェク ター分子の少なくとも1つの機能 (例えば、エフェクター分子の酵素活性、抗血管新生活 性、もしくは抗腫瘍活性等)を保持する一次または二次エフェクター分子の断片を意味す 80

[0077]

融合タンパク質: 一次もしくは二次エフェクター分子のアミノ酸配列、またはその機能 性断片もしくは誘導体と、異種ポリペプチド (例えば、非一次または非二次エフェクター 分子)のアミノ酸配列と、を含むポリベブチドを意味する。

[0 0 7 8]

Omp様タンパク質: 本明細書で用いる用語「Omp様タンパク質」とは、あらゆる編 40 繭の外膜タンパク質またはその一部分(例えば、シグナル配列、リーダー配列、周辺細胞 質領域、膜貫通ドメイン、複数回膜貫通ドメイン、またはこれらの組合せ)を意味する。 具体的態様では、Omp様タンパク質は、OmpA、OmpB、OmpC、OmpD、O mpE、OmpF、OmpT、ポーリン様タンパク質、PhoA、PhoE、IamB、 8-ラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ、ペプチドグ リカン結合リポタンパク質 (PAL)、FepA、FhuA、NmpA、NmpB、Nm p C 、または主要な外膜リポタンパク質 (例えば L L P) 等の少なくとも一部分である。 [0079]

精製された: 本明細書で用いる「精製された」弱毒化腫瘍標的細菌株は、混入タンパク 質またはアミノ酸(例えば、死滅した細菌からの残屑)または培地を実質的に含まない。 59 混入ケンパク質またはアミノ酸を実質的に含まない弱毒化腫瘍標的細菌株はまた、約30 %、20%、10%、もしくは5%(乾燥重量基準)以下の混入タンパク質またはアミノ 腰を含む野毒化腫瘍傷的細菌も意味する。

[0080]

放出因子: 本明總書で用いる放出因子は、細菌成分の放出を増強するあらゆるタンパク 賃またはその一部分を意味する。一実施形態では、放出因子は、パクテリネシン飲出タン パク質である。放出因子としては、限定するものではないが、クロアシンD13プラスミ ドによってコードされるバクテリオシン放出タンパク質(BRP)、コリシンB1~E9 プラスミドによりコードされるBRP、あるいは、コリシンA、NまたはDブラスミドに よりコードされるBRPが挙げられる。

[0081]

敗血を性ショック: 敗血を性ショックは、TNF-αにより関始される複合サイトカインカスケードによる内部臓器不全の状態である。酸生物またはベクターがTNF-αを誘導する相対能力を示す1つの基準として用いられる。

[0082]

順響機的(tumorーtargeted): 腫瘍標的とは、非極性の対応調胞または 組織に比べて、巻性の標的細胞または組織に優先的に肩毛化し、複製する能力として完義 される。従って、サルモネラのような腫瘍標的細菌は、低性の標的細胞または腫瘍環境に 優先的に結合し、感染し、かつ/または依然として生存可能である。

[0083]

幸力: 春力は、疾病を引き起こす一般的能力を表す相対語であり、正常細胞を死滅させ る能力、または敬血症性ショック(以下の具体的定義を参照)を誘導する能力が含まれる

100841

本明細書において、株の名称VNF2009(国際公園番号WO99/13053)、 YS1646および41.2.9は、互換的に用いられ、それぞれ、American Type Cuitare Coiiectionに寄話され、気部番号202165が与 えられた株を指す。株の名称YS1456および8.7は、互換的に用いられ、それぞれ 、American Type Cuiture Coiiectionに寄託され、気託 コ 着号202184が与えられた株を指す。

【0085】 本発明は、D

本発明は、以下に行う詳細な説明、具体的実施形態の例示、および派付の図面を参照する ことにより、さらによく理解されるであるう。 【3086】

100001

4. 図面の簡単な説明

図面の簡単な説明については本明細書の最後を参照のこと。

[0087]

5. 本発明の詳細な説明

3. 全型型の経過度級別 本発明は、耐等化腫暴機的細菌体を用いて、高レベルの治療用一次エフェクター分子を腫 響に送達するものである。本発明は、所定の一次エフェクター分子の潜在的会身性物性(例えば、TNFーαによって起こる飲血症性ショック)を回避するという利点をもたらす 。本発明は、1つ以上の一次エフェクター分子が場合に応じて、1つ以上の二次エフ エクター分子を固形態態に送達する。さらに具体的には、本発明は、適場合に応じて、1つ 以上の二次エフェクター分子を固形態態に送達する。さらに具体的には、本発明は、適場合に応じて、1つ 以上の二次エフェクター分子を透達する。さらに現体的には、本発明は、適場合に応じて、1つ 以上の三次エフェクター分子を透達するためのベクターとして、例えば、サルモネラ等の 明書化腫瘍標的細菌を翻響かおび使用することを包含する。 大部の一次本の一分子を活達する。 理解信的細菌は、過性好質性質または適性維気性菌であり、これらは、1つ以上の一次エ フェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードするよう 50 50 [0 0 8 8 1

ここに記載される弱毒化腫瘍標的細菌に基づく送達系は、固影腫瘍の部位への1つ以上の エフェクター分子の局所送達を提供する。本祭明は、宿主に全身投与する場合には、崇件 でありうる、または望ましくない副作用(例えば、望ましくない免疫作用)を誘導する恐 れがある一次エフェクター分子を、宿主への毒性を低下させたサルモネラ等の弱毒化腫瘍 標的細菌によって腫瘍に局所送達することができる、安全かつ効果的な方法を提供する。 本発明はまた、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌により送達される、1つ以上の一次エ フェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子の組合せ後達を提 供する。さらに本発明は、1つ以上の異なる一次エフェクター分子、および場合に応じて 、1つ以上の異なる二次エフェクター分子を保有する、異なる態素化腫瘍機的細菌の組合 10 せ送達を提供する。

[0089]

また、本発明は、固形腫瘍の部位で設融合タンパク質を発現させるように操作された弱毒 化腫瘍標的細菌によって、エフェクター分子を含む1つ以上の融合タンパク質を扇所渓達 する方法を提供する。一実施形態では、弱塩化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドとエフ エクター分子からなる融合タンパク質を発現するように操作される。別の実施形態では、 弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチドと、タンパク質分解切斷部位と、エフェクター 分子からなる融合タンパク質を發現させるように操作される。別の実施影能では、記念化 腫瘍標的細菌は、フェリーペプチドとエフェクター分子からなる融合タンパク質を発現さ せるように操作される。さらに別の実施影態では、弱毒化腫瘍媒的細菌は、シグナルペプ 20 チドと、フェリーペプチドと、エフェクター分子からなる融合タンパク質を登現させるよ うに操作される。さらにまた別の実施彩態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、シグナルペプチ ドと、タンパク質分解切断部位と、フェリーペプチドと、エフェクター分子からなる融合 タンパク質を発現させるように操作される。弱毒化腫瘍標的細菌は、本発明の1つ以上の 融合タンパク質と、本発明の1つ以上のエフェクター分子を発現させるように操作される

[0 0 9 0]

本発明はまた、製薬上許容される担体と、1つ以上のエフェクター分子をコードする1つ 以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍膿的細菌と、を含有する医薬組成物を 提供する。さらに、本発明は、製薬上許容される担体と、1つ以上の一次エフェクター分 30 子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように 操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含有する医薬組成物も提供する。さらに、本発明は 、爨薬上許容される担体と、1つ以上の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分 子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された弱毒化腫瘍標的細菌と、を含 有する医薬組成物を提供する。

[0091]

本発明は、動物における固影腫瘍癌を治療する方法であって、1つ以上の一次エフェクタ 一分子をコードする1つ以上の核酸分子を発現すように操作された弱悪化腫瘍機的細菌を 、治療を要する動物に投与することを含んでなる方法を提供する。本発明はまた、動物に おける固形腫瘍癌を治療する方法であって、そのような治療が必要な動物に、1つ以上の 40 一次エフェクター分子および1つ以上の二次エフェクター分子をコードする1つ以上の核 酸分子を発現するように操作された弱毒化腫瘍標的細菌を投与することを含んでなる方法 を提供する。さらに、本発明は、動物における固形腫瘍癌を治療する方法であって、その ような治療が必要な動物に、1つ以上の融合タンパク質および1つ以上のエフェクター分 子をコードする1つ以上の核酸分子を含むように操作された配差化類無梗的細菌を抄与す ることを含んでなる方法を提供する。好ましくは、上記動物は、哺乳動物(例えば、イヌ 、ネコ、ウマ、ウシ、サル、またはブタ)であり、さらに好ましくは、動物はヒトである 。固形腫瘍癌の例として、限定するものではないが、肉腫、癌腫、リンパ腫が挙げられ、 その他の固形腫瘍癌として、限定するものではないが、乳癌、前立腺癌、子宮頚癌、子宮 癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状細胞腫、グリオーマ、膵臓癌、胃癌、肝臓癌 50 、大腸癌、中枢神経系の癌、生殖細胞系の癌、腎臓癌、膀胱癌、および中皮種が挙げられる。

[0092]

特定の作用機構に測膜する 室図はないが、本発明者らは、本発明に従い、エフェクター分子を含む弱毒化腫悪糖的細菌ベタターの送達によって、腫瘍の部位にエフェクター分子の 標的発訊が速度されると考える。

[0093]

明瞭にするため、辞編な説明を次の小節に分けるものとする:緬窗ベクター;腫瘍治療の ための一次エフェクター分子:一次エフェクター分子との共発現のための二次エフェクタ 一分子:誘導体と類似体;融合タンパク質:発現ベクター;ならびに、送達のための方法 10 および組成物。

[0094]

5.1. 細菌ベクター

本発明の方法では、あらゆる弱端化腫瘍標的細菌を用いることができる。さらに具体的には、本発明の方法では、おられる弱線化腫瘍経動細菌は、近性好気性菌または過性療気性菌をある。本分期の方法で用いられる30歳化腫瘍経動は固まるたは過性療気性菌または適性療気性菌が最終的細菌の例としては、限定するものではないが、腸管組織侵入性大腸菌等の大腸菌、サルモネラ種(Salmonellaspp.)、赤精菌種(Shigellaspp.)、エルシェ・エンテロリチカ(Yersiniaenterocolitica)、単球虚リステリア(Listeriamonocytogenies)、とトマイコプラズマ(Mycoplasmahominis)、およびレンサ球園種(Streptocous spp.)が挙げられる。

[0095]

弱毒化および騒傷ターゲッティングに 寄与する 田子を本明細書に配載するが、これらを用いて、本発明の方法で使用する好通な細菌株を構築または選択することができる。例えば、腫瘍癌的細菌を選択および単應する方法については、国際公園各分Wの96 4 0 2 3 8 の第6 1 1 節に配載され、また、細菌を弱毒化する方法については、同時 6 2 章に記載されてまる。尚、この文章は、参照により本明細書に全文を組み込むものとする。弱毒化能態係されている。内、この文章は、参照により本明細書に全文を組み込むものとする。弱毒化能態等線的調査の何は、国際出願Wの99 / 1 3 0 5 3 (参照により本明細書に全文を組み込む)にも記載されている。本発明の特定の実施形態では、当業者には公知の方法で細 30 菌を修飾することにより、映動化または高度に弱勢化することができる。

[0096]

※発明は、1つ以上の一次エフェクター分子(例えば、TNFファミリーメンバー、鋼塩 傷害性ペプチドまたはポリペプチド、腫瘍阻害酵素、もしくは抗血管新生因子)を単純が 、または1つ以上の二次エフェクター分子と組み合わせて送達するペクターとして、弱時 化腫瘍除的細菌を提供する。本発明はまた、1つ以上の本発明の融合タンパク質を単執が 、または1つ以上のエフェクター分子と組み合わせて送達するペクターとして、副郷化腫 森稼的細菌を提供する。本発明の好ましい実施影繁では、エフェクター分子および/また は融合タンパク質をコードする1つ以上の核酸分子を発現するように操作された緑郷化腫 線線的細菌は、サルモネラである。

[0097]

以下の節では、特にサルモネラに関して教示するが、本発明の組成物および方法は、何 サルモネラに限定されるわけではなく、教示が適用するあらめる他の細菌を包含する。 追した細菌権として、限定するものではないが、 場合組織侵入性大勝菌・サルモネラ種、赤硝菌種、エルシニアエンテロコリチカ、 単球症リステリア、ヒトマイコプラズ マ、およびレンサ球菌種が挙げられ、ここで、該細菌は、 通性好気性菌または通性癖気性 商である。

[0098]

5.1.1 サルモネラベクター

本発明の教示に従い、あらゆる弱毒化腫激標的細菌を修飾して、1つ以上の一次エフェク 50

ター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコードすることにより 、本発明の1つ以上のエフェクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の弱毒化腫 瘍標的細菌を作製することができる。さらに、本発明の教示に従い、あらゆる弱毒化腫瘍 標的細菌を修飾して、本発明1つ以上の融合タンパク質および場合に応じて、本発明の1 つ以上のエフェクター分子をコードすることにより、本発明の融合タンパク質およびエフ エクター分子を固形腫瘍に送達するのに有用な新規の弱毒化腫瘍標的細菌を作製すること ができる。

[0099]

サルモネラ等の細菌は、ヒトおよび動物の疾病を引き起こす病原体である。サルモネラに よって発生し得る疾病の1つは、敗血症であり、これは、敗血症性ショックの発作に関連 10 する高い死亡率 (Bone. 1993, Clinical Microbiol, Re vs. 6:57-68) のために、深刻な問題である。従って、本発明で、サルモネラ ベクターを安全に使用できるようにするためには、サルモネラ等の細菌ベクターの病原性 を低減(弱毒化)する。本発明では、弱毒化は、微生物ベクターを修飾することにより、 該微生物ベクターの病原性を低減するという従来の定義に加えて、微生物ベクターを修飾 することにより、低力価の該誘導微生物ベクターを患者に投与し、それでも尚、高力価の 親徽生物ベクターを投与したのと同等の結果を達成できるようにすることも含む。その結 果、ベクターを患者に投与したことによる寒性ショックまたはその他の副作用の危険性を 低下させることができる。このように弱毒化された細菌は、多数の技法により巣障される 。例えば、宿主細胞、特にマクロファージおよび好申録内での細菌の生存を確実にするビ 20 ルレンス (virulence) 因子をコードするDNA配列の欠失または破壊により、 弱毒化を達成することができる。このような欠失または破壊技法は、当業者には公知であ り、例えば、相同的組換え、化学的突然変異誘発、放射線突然変異誘発、もしくはトラン スポゾン突然変異誘発が挙げられる。マクロファージ内での生存に関連するビルレンス因 子は、例えば、酸性化のようなストレスシグナルに応答して、またはマクロピノサイトー シス等の宿主細胞防御機構に応答して、通常、マクロファージ内で特異的に登現される(Fields 6, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 :5189-5193)。国際公開番号WO96/40238の表4には、欠失によって 弱毒化が起こるサルモネラ・ビルレンス因子が例示的に列挙されている。

[0100]

サルモネラのような細菌ベクターの弱毒化の別の方法は、細菌の毒性の原因となる細菌の 置換基を修飾するものである。例えば、リポ多鎔(LPS) または内毒素は、細菌性敗血 症の病理作用の主な原因である。この応答を起こすLPSの成分は、リピドA(「LA)) である。LAの毒性作用の排除または軽減により、1)患者における敗血症性ショック の危険性が低下すると共に、2) さらに高レベルの細菌ベクターを許容できることから。 弱毒化細菌が得られる。

[0 1 0 1]

サルモネラのような細菌のLA含有率の改変は、LPS生合成経路に突然変異を導入する ことにより達成することができる。LPS生合成におけるいくつかの酵素段階、およびサ ルモネラ内でそれらを制御する遺伝子座、ならびに対応する突然変異体が確認されている 40 (Raetz, 1993, I. Bacteriol, 175:5745-575348 よびその中の参考文献)。このような突然変異体の一例として、firAがあるが、これ は、酵素UDP-3-0 (R-30ヒドロキシミリストイル) -グリコシアミンN-アシ ルトランスフェラーゼをコードする遺伝子内の突然変異であり、該酸素は、内毒素生合成 における第3段階を調節する (Kelley5、1993、J. Biol. Chem. 268:19866-19874)。このタイプの突然変異を損持する細菌株はリビド Aを生産するが、これは第7脂肪酸、すなわちヘキサデカン酸、を含むという点で野牛類 リビドAとは異なる(RoyおよびColeman, 1994, J. Bacteri ol. 176:1639-1646)。RoyおよびColemanは、内毒安牛合成 における第3段階の遮断のほかに、firA 空然変異は、リビドA生合成の第6段階を 50 調節するリビドA 4'キナーゼの酵素活性を低下させることも明らかにした。

[0 1 0 2]

弱毒化に加えて、本発明の細菌ベクターは腫瘍ターゲッティングされる。すなわち、細菌 は、正常組織、非腫瘍または非腫瘍細胞に対して、腫瘍または腫瘍細胞に優先的に結合し 、感染し、かつ/または依然として生存可能である。弱毒化腫瘍裸的細菌を取得するのに 適した方法は、国際公開WO96/40238の第6、1節(第25~32頁;腫瘍ター ゲッティング) および第6、2.2節(第43~51頁;弱毒化) に記載されており、該 文献は、参照により本発明に組み込まれるものとする。こうして得られるベクターは高度 に特異的で、かつ重感染性であることから、標的腫瘍または腫瘍細胞に存在する感染細菌 の数と、非癌性対応部でのそれとの差は、微生物培養物の稀釈度が増加するほど大きくな 10 るため、これまでより低力値の微生物ペクターを用いて、正の結果を得ることができる。 また、国際公開WO96/40238に記載される技法を用いて、弱毒化腫瘍標的サルモ ネラまたは非サルモネラ細菌ベクターを作製することも可能である。

[0 1 0 3]

LSP経路突然変異を有する弱毒化腫瘍線的細菌の一例が、国際公開WO99/1305 3に記載されたm s b B * サルモネラ突然変異体である。尚、該文献は、参照により本明 aa書に組み込むものとする。特に、m s b B - サルモネラ突然変異体の特徴について説明 する第6、 1, 2節を参照されたい。ms bB サルモネラの1つの特徴は、野生製細菌 ベクターと比較して、TNF-a応答を誘導する能力が低下していることである。mab B サルモネラは、野生型細菌ベクターの誘導レベルと比較して、約5%から約40%の 20 レベルでTNFーα発現を誘導する。

[0104]

全細菌または単離もしくは精製されたLPSにより誘導されるTNF-々広答は、因相酸 素免疫検定法(ELISA)等、市販のアッセイ装置を用いて、in vitroまたは in vivoで評価することができる。コロニー形成単位(c.f.u.)当たりの、 またはμg/kgに基づくTNF−α生産の比較を用いて、相対活性を決定する。単位当 たりのTNFーαレベルが低いほど、TNFーα生産の誘導が減少していることを示す。 好ましい実施影態では、m s b B " サルモネラベクターを修飾して、本発明の1つ以上の 一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を含むよう にする。

[0105]

本発明はまた、m s b B * 弱毒化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体の使用も包含す る。本発明の数示に従い、msbB。配盡化腫瘍標的サルモネラ突然変異体の誘導体を修 節し、1つ以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクタ 一分子をコードすることにより、本発明の1つ以上のエフェクター分子を問託階級に送達 するのに有用な新規の腫瘍標的細菌を作製することができる。

[0106]

患者への治療の過程で、さらに毒性の高い衰規型に復帰しないような、弱毒化衰現型の安 定性は重要である。このような安定性は、例えば、ビルレンス遺伝子が、エピスタシス的 (epistatically)ではなく、欠失または染色体レベルでのその他の非復帰 40 突然変異によって破壊されるように備えることにより、獲得することができる。

[0107]

弱毒化表現型を安全にする別の方法は、例えば、msbB-突然変異(国際公開WO99 /13053) のように、リビドA生産用の経路における突然変異や、Bochner, 1980. J. Bacteriol、 143:926-933により記載されたウラ シル生合成、プリン生合成、およびアルギニン生合成のように、1以上の栄養紊または代 謝物の栄養要求性突然変異体への1以上の突然変異等、1以上の方法で弱毒化されるよう に、細菌を操作することである。好ましい実施影態では、少なくとも1種の一次エフェク ター分子をコードまたは発現する腫瘍標的m s b B ** サルモネラもまた、プリンに対して 栄養要求性である。特定の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子をコー 50

ドまたは発視する弱毒化腫瘍標的細菌は、AroA、msbB、PurIまたはSerC における突然変異の存在によって、弱毒化される。他の実施形態では、少なくとも1種の 一次エフェクター分子をコードする弱毒化腫瘍標的細菌は、AroA、msbB、Pur I またはSerじにおける欠失の存在によって、弱寒化される。

[0 1 0 8]

従って、本発明の方法では、あらゆる弱恚化腫瘍標的細菌を用いて、1つ以上の一次エフ ェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現し、固形贖傷 癌に送達することができる。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は、1つ以上の 一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子を発現する ように構築する。さらに、本発明の方法では、あらゆる弱毒化腫瘍標的細菌を用いて、1 10 つ以上の融合タンパク質および場合に応じて、1つ以上のエフェクター分子を発現し、固 形腫瘍癌に浅溢することができる。好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍種的細菌は、1つ 以上の融合タンパク質および場合に応じて、1つ以上のエフェクター分子を発現するよう に機能する。

[0 1 0 9]

5,2. 腫瘍治療のための一次エフェクター分子

本発明は、サルモネラ等の弱毒化腫瘍標的細菌による、一次(および場合に応じて、二次) エフェクター分子の送達を達成する。本発明のエフェクター分子は、タンパク質性分子 (例えば、タンバク質 (限定するものではないが、ペプチド、ポリペプチド、タンバク質 、翻訳後修飾タンパク質等を含む)) である。本発明はさらに、本発明の一次エフェクタ 20 一分子をコードする核酸分子を提供する。

[0110]

一次エフェクター分子は、あらゆる公知の生物、例えば、限定するものではないが、動物 、植物、細菌、真菌、および原生生物、またはウイルス等に由来するものでよい。本発明 の好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、哺乳動物に由来する。さらに好まし い実施形態では、一次エフェクター分子は、ヒトに由来する。本祭明の一次エフェクター 分子は、TNFファミリーのメンバー、統血管新生因子、細胞傷害性ポリペプチドまたは ペプチド、腫瘍阻害酵素、ならびに、これらの機能性断片を含む。

[0111]

具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、TNFファミリーのメンバーま 35 たはその機能性筋片である。TNFファミリーのメンバーの例としては、限定するもので はないが、腫瘍壊死因子α(TNF-α)、腫瘍壊死因子β(TNF-β)、TNF-α 関連アポトーシス誘導性リガンド(TRAIL)、TNFーα関連活性化により誘導され るサイトカイン(TRANCE)、TNF-a闍連の弱いアポトーシス誘導物質(TWE AK) CD401#2F (CD40L) LT-a, LT-a, LT-B, OX40L CD4OL, Fast, CD27L, CD30L, 4-1BBL, APRIL, LIG HT、TL1、TNFSF16、TNFSF16、TNSF17およびAITR-Lが終 げられる。好ましい実施影像では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍壊死因子 a (TNF-a)、腫瘍壊死因子g(TNF-g)、TNF-a関連アポトーシス誘導性リガ ンド (TRAIL) 、TNF-α関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANC 40 E)、TNF-a関連の弱いアポトーシス誘導物質(TWEAK)、CD40リガンド(CD40L)、もしくはこれらの機能性断片である。これらについて詳しくは、例えば、 TNFファミリーのメンバーを記載したKwon, B. ら、1999. Curr. O pin. Immuno1. 11:340-345を参照されたい。また、以下の表1は 、TNFファミリーのメンバー例の古典的名称および標準化された名称の一覧を示す。本 発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍壊死因子 a (T N $F-\alpha$) 、腫瘍壊死因子 β (TNF- β) 、TNF- α 関連アポトーシス誘導性リガンド (TRAIL)、TNF-α関連活性化により誘導されるサイトカイン (TRANCE) 、TNF-α関連の弱いアポトーシス誘導物質 (TWEAK)、もしくはCD4 0リガン ド (CD40L) である。

[0 1 1 2] [表 1]

TNF ファミリーのメンバー			
古典的名称	標準化された名称		
LT-α	TNFSFI		
TNF-α	TNFSF2		
LT-B	TNFSF3		
OX40L	TNFSF4		
CD4OL	TNESES		
Fall	TNFSF6		
CD27L	TNFSF7		
CD30L	TNFSF8		
4-1BBL	TNFSF9		
TRAIL	TNFSF10		
TRANCE	TNFSF11		
TWEAK	TNFSF12		
APRIL	TNFSF13		
LIGHT	TNFSF14		
TLI	TNFSF15		
	TNFSF16		
	TNFSF17		
AIT'R-L	TNFSF18		

16

20

[0113]

別の具体的突施影態では、本発明の一次エフェクター分子は、統血管新生因子もしくはそ の機能性断片である。抗血管新生因子の例として、限定するものではないが、エンドスタ チン、アンギオスタチン、アポミグレン、抗血管新生抗トロンピンIII、フィブロネク チンの29kDa N末端および40kDa C末端タンパク質分解断片、uPA受容体ア ンタゴニスト、プロラクチンの16kDaタンパク質分解断片、血小板第4因子の7.8 k D a タンパク質分解断片、13.40と称する抗血管新生因子、トロンポスポンジン Iの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチ ド魴片、RGDおよびNGR含有ペプチド、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲ ンおよびEGFの小さい抗血管新生ペプチド、ならびに、インテグリンα。β、およびV EGF受容体のペプチドアンタゴニストが挙げられる。

[0]14] 本発明の好ましい実施形態では、本発明の一次エフェクター分子はエンドスタチンである 。天然のエンドスタチンは、コラーゲンXVIIIのC末端の約180アミノ酸からなる (コラーゲンXVIIIの2つのスプライス形態をコードするcDNAは、Genban

k 登録番号AF1801およびAF18089を有する)。

[0 1 1 5]

本発明の別の好ましい突施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、ブラスミノーゲ ン断片である(プラスミノーゲンのコード配列は、Genbank登録番号NM-000 301およびA33096) にみいだすことができる)。アンギオスタチンペプチドは、 言うまでもなく、プラスミノーゲンの4つのクリングルドメイン、すなわち、クリングル 1~クリングル4を含む。組換えクリングル1、2および3は、天然ペプチドの抗血管新 生特性を有するのに対し、クリングル4にはそのような活性がない (Caoち、1996 J. Biol. Chem. 271:29461-29567)。従って、本発明の アンギオスタチンエフェクター分子は、クリングル1、クリングル2およびクリングル3 からなる群より選択される少なくとも1つの、好ましくは、1つ以上のクリングルドメイ ンを含む。具体的実施影態では、本発明の一次エフェクター分子は、40 kDaイソ型 、42 kDaイン型、45 kDaイン型、またはこれらの組合せからなる謎より選択さ れるヒトアンギオスタチン分子である。別の実施形態では、該一次エフェクター分子は、 プラスミノーゲンのクリングル5ドメインであり、これは、アンギオスタチン (アンギオ スタチンはクリングルドメイン1~4からなる)より強力な血管新生阻害物質である。 [0116]

別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、アンチトロンビンIIIである。 アンチトロンピンIIIは、以後アンチトロピンと呼び、これは、タンパク質を血管壁に 連結するヘパリン結合ドメインと、トロンピンと相互作用する活性部位ループとを含む。 アンチトロンビンをヘパリンと結合させると、タンパク質はコンホメーション変化を引き 起こし、これによって、活性ループがトロンピンと相互作用し、その結果、トロンピンに 20 よる該ループのタンパク質分解切断が起こる。タンパク質分解切断事象により、アンチト ロンピンのコンホメーションにさらに別の変化が起こり、これによって(1) トロンピン とアンチトロンビンとの間の相互作用界面が改変され、(ii) へバリンから複合体が放 出される (Carrell, 1999, Science 285:1861-1862 、およびその中の参考文献)。 O'Reillyら(1999, Science 285 :1926-1928)は、切断されたアンチトロンピンが、強力な抗血管新生活性を有 することをみいだした。従って、一実施形態では、本発明の抗血管新生因子は、抗血管新 生形態のアンチトロンピンである。本発明の方法に従う因形腫瘍への上記タンパク質の送 連のために、細菌ベクターを修飾し、全長アンチトロンピンGenbank登録番号NM -000488およびアンチトロンビンの切断を触媒するタンパク質分解酵素を発現させ 30 ることにより、抗血管新生彩鎖のタンパク質を生成する。タンパク質分解酵素は、トロン ピン、摩エラスターゼ、およびヒト好中球エラスターゼからなる辞より選択される。好ま しい実施形態では、タンパク質分解酵素は弊エラスターゼである。機能性弊エラスターゼ の組換え発現の方法は、Shirasuにより数示されている (Shirasub、19 87. I. Biochem. 102:1555-1563). [0117]

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、フィブロネクチンの40 k D a および/または29 k D a タンパク質分解断片である。これら断片の発現ベクタ ーは、フィブロネクチン前駆体タンパク質をコードする全長核酸配列(Genbank登 録番号X02761)、およびコードされたタンパク質の成熟化についての記載事項 (d 40 escription)を用いた標準的方法により生成することができる。好ましい実施 形態では、フィブロネクチンの40 kDaおよび/または29 kDa断片は、例えば、 pTrc99Aプラスミドへの挿入により、trcプロモーターの制御下で細胞質タンパ ク質として発現させる。

[0118]

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、ウロキナーゼブラスミノ ーゲン活性化因子 (uPA) 受容体のアンタゴニストである。実施形態の一態様では、該 アンタゴニストは、uPAのドミナントネガティブ突然変異体である(例えば、Crow leyb, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:50 21-5025)。実施形態の別の態様では、アンタゴニストは、ペプチドアンタゴニス 50

トまたはその融合タンパク質である(Goodsonら、1994、 Proc. Nat 1. Acad. Sci. USA 91:7129-7133)。実施彩態のさらに別の 態様では、アンタゴニストは、ドミナントネガティブ可溶性 n P A 受容体である(M i n 5, 1996. Cancer Res. 56:2428-2433) . [0 1 1 9]

本発明の別の実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、約120のアミノ酸から なる、プロラクチンの16 kDa N末端断片、またはその生物学的に活性な断片である (プロラクチンのコード配列は、Genbank登録番号NM_000948にみいだす ことができる)。具体的実施形態では、上記プロラクチン断片は、ジスルフィド結合によ るタンパク質の不要な架橋を回避するため、Cys58-Ser58突然変異を有する。

本発明の別の好ましい実施影態では、本発明の一次エフェクター分子は、7.8 kDa 血小板第4因子断片である。具体的実施形態では、7.8 kDa 血小板第4因子断片は 、融合タンパク質として発現され、該融合タンパク質において、アミノ末端は、大腸菌8 グルクロニダーゼの最初の35アミノ酸からなる。別の実施彩態では、血小板第4因子の ヘパリン結合性リシンをグルタミン酸残基に突然変異させることにより、強力な抗血管新 生活性を有する変異型タンパク質が得られる(Maioneら、1991, Cance r Res. 51:2077-2083)。血小板第4因子のコード配列は、Genha nk 登録番号NM-002619である。

[0 1 2 1] 本発明の別の好ましい実施影響では、本発明の一次エフェクター分子は、血小板第4因子 の抗血管新生13アミノ酸断片、13、40と称する抗血管新生因子、トロンポスポジン Iの抗血管新生22アミノ酸ペプチド断片、SPARCの抗血管新生20アミノ酸ペプチ ド断片、ラミニン、フィブロネクチン、プロコラーゲンもしくはEGFの小さい抗血管新 生ペプチド、またはインテクリンα、β。もしくはVEGF受容体の小さいペプチドアン タゴニストに相当する小さなペプチドである。具体的実施形態では、小さいペプチドをタ ンデムに発現させることにより、タンパク質安定性が高まる。小さいペプチドの配列は、 VEGF受容体アンタゴニスト (Soker6、1993, J. Biol. Chem . 272:31582-31588) を除いて、Cao (1998, Prog. Mo 1. Subcell. Biol. 20:161-176) により提供されている。極 30 めて好ましい実施形態では、小さいペプナドは、RGDまたはNGRモチーフを含む。こ の実施形態の特定の様式では、RGDまたはNGRモチーフを含むペプチドは、何えば、 OmpAの1つ以上の細胞外ループをコードする核酸と、読み終を合わせて該ペプチドを コードする核酸を融合することにより、宿主細菌の細胞表面上に提示される。 [0 1 2 2]

別の具体的実施形態では、本発明の一次エフェクター分子は、細胞傷害性ポリペプチドま たはペプチド、もしくはそれらの機能性断片である。細胞傷害性ポリペプチドまたはペブ チドは、例えば、タンパク質合成の干渉または細胞周期の破壊を介して、細胞増殖を阻害 することにより、細胞に対して毒性を有するか、または細胞分裂を抑制する。このような 物質は、rRNAまたはリポ核タンパク質を切断するか、伸長因子を阻害するか、mRN 40 Aを切断することにより、あるいは、タンパク質合成を、細胞が生存できないようなレベ ルにまで低下させるその他の機構によって、作用すると考えられる。 [0 1 2 3]

細胞傷害性ポリペプチドまたはペプチドの例として、限定するものではないが、下記のも のが挙げられる:バクテリオシンファミリーのメンバー、ベロ毒素、細胞傷害性壊死因子 1 (CNF1:例えば、大腸菌CNF1およびVibrio fischeri CNF1)、細胞傷害性壊死因子2(CNF2)、Pasteurella multiocid a毒素 (PMT)、溶血素、ファルネシルトランスフェラーゼの強力な競合阻害物質であ るCAAXテトラペプチド、サポリン、リシン、アプリン、その他のリポソーム不活性化 タンパク質 (RIP)、シュードモナス外毒素、DNA、RNAまたはタンパク質合成の 50 阻害剤、アンチセンス核酸、その他の代謝阻害物質(例えば、DNアーゼおよびリポヌク レアーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、ホスホリバーゼ等のDNAまたはRNA切断分子) . プロドラッグ変換酵素(例えば、HSV由来のチミジンキナーゼおよび細菌シトシンデ アミナーゼ)、光活性化ポルフィリン、リシン、リシンA鎖、トウモロコシRIP、ゲロ ニン、細胞致死拡大(cytolethal distending) 毒素、ジフテリア 毒素、ジフテリア毒素A鎖、トリコサンチン、トリチン、アメリカヤマゴボウ抗ウイルス タンパク質 (PAP) 、ミラビリス (mirabilis) 抗ウイルスタンパク質 (MA P)、ジアンチン32および30、アブリン、モノドリン、ブリオジン、志賀巻素(sh i g a) 、キュウリの種子からのタンパク質生合成の触媒阻害物質 (例えば、国際公開W 〇93/24620を参照)、シュードモナス外毒素、大腸菌熱不安定性毒素、大腸菌熱 10 安定性毒素、EaggEC安定性毒素-1 (EAST)、細胞毒素の生物学的に活性の断 片、ならびに、当業者には公知のその他の物質。大腸菌およびサルモネラの毒素について は、例えば、<u>Escherichia and Salmonella</u>. Cellula <u>r and Molecular Biology</u>, Neidhardtら (編) における O' BrianBLOHolmesKLZProtein Toxins of Esch erichia coli and Salmonella, pp. 2788-2802, ASM Press. ワシントンD. C. を参照されたい。 [0 1 2 4]

好ましい実施影態では、一次ユフェクター分子は、バクテリオシンファミリーのメンバー (例えば、Konisky, 1982, Ann. Rev. Microbiol. 3 6:125-144巻照)であるが、ただし、該バクテリオシンファミリーのメンバーは 、バクテイロシン放出タンパク質(BRP)ではない。バクテリオシンファミリーのメン パーの例として、限定するものではないが、CoIE1、CoIE1a、CoIE1b、 ColE2, ColE3, ColE4, ColE5, ColE6, ColE7, ColE 3、ベスチシンA1122、スタフィロコクシン1580、ブチリシン7423、ビオシ ンR 1またはAP41、メガシンA-216、ミクロシンM15、およびピプリオシン(Jayawardene≱LUFarkas-Himsley, 1970, J. Ba cteriology vol. 102 pp 382-388) が挙げられる。最も好ま しくは、一次エフェクター分子は、コリシンE3またはVであるが、コリシンA、E1、 30 E2、Ia、Ib、K、L、およびM (Konisky, 1982, Ann. Rev Microbiol。36:125-144参照)も、一次エフェクター分子として 適している。この実施形態の別の好ましい態様では、バクテリオシンは、クロアシンであ り、最も好ましくは、クロアシンDF13である。 [0125]

好ましい実施形態では、一次エフェクター分子は、ColEl、ColE2、ColE3 、ColE4、ColE5、ColE6、ColE7、ColE8、またはColE9で ある。コリシンE3 (ColE3) は、白血病細胞モデル系 (Fiskaら、1978、 Experientia 35:406-40) 等の哺乳動物細胞 (Smarda6、1 978, Folia Microbiol. 23:272-277) に漢く細胞傷害性 作用を及ぼすことがわかっている。ColE3の細胞毒性は、タンバク質合成を停止する 機能であり、これは、80Sリポソームの阻害により媒介される(Turnowskyち 1973. Biochem. Biophys. Res. Comm. 52:327 -334)。さらに具体的には、ColE3は、リボヌクレアーゼ活性(Saunder s. 1978. Nature 274:113-114) を有する。その天然形態では ColE3は、1:1の比で50kDaおよび10kDaタンパク質からなる60kD aタンパク質複合体であり、大きい方のサブユニットはヌクレアーゼ活性を有し、また、 小さい方のサブユニットは50kDaサブユニットの阻害機能を有する。このように、5 OkDaタンパク質は、細胞傷害性タンパク質 (または毒素) として作用し、10kDa タンパク質は、抗毒素として作用する。従って、一寒燥形態では、ColR3を二次エフ 50 ェクケー分子として用いる場合には、大きい方のColE3サブユニットもしくはその花性断片を単独で、または小さい方のサブユニットより高いレベルで発現させる。本発明の別の実施形態では、ColE350kDa衛素および10kDa抗毒素を、サルモネラ等の影動化腫瘍機的調菌内の単一プラスミドにコードさせる。この実施彩態では、毒素ノ抗毒素は、プラスミドラスミドな大きの悪死素として作用ることができ、これにより、設プラスミドを欠失したサルモネラは上記毒素により死減する。別の実施彩態では、10kDa抗毒素は、プラスミドとのcolE3毒素から睫れて染色体上にあり、低の額に対する透過隆量を発している(以下の第566多数例)。

[0126]

本発明の別の好ましい突越形態では、一次エフェクター分子は、クロアシンDF13である。クロアシンDF13は、COIB3と同様に機能する。クンパク蜀複合体は、67kD3分子曼である。個々の成分のサイズは、57kD3および9kDaである。リポヌクレアーゼ活性以外に、DF13は、細胞カリウムの漏出を引き起こすことができる。

[0127]

別の好ましい実施彩版では、一次エフェクター分子は、コリシンVである(Plasmi ds、 a Practical Approach 1987, K. G. Hardy編に おけるPugsley, A. P. およびOudega, B. による" Methods for Studying Colicins and Their Plasmids"; Gilson, L. ら、EMBO J. 9:3875-3884)。

[0128]

別の実施形態では、一次エフェクター分子は、下記のものである:コリシンB2(構造は 、CoIE3に類似した二重サプユニットであるが、リポヌクレアーゼ活性ではなく、エ ンドヌクレアーゼ活性を有する):イオン透過性チャンネルを形成し、細胞のプロトン駆 動力を崩壊させ、細胞死に至らしめるコリシンA、E1、Ia、IbまたはK;タンパク 質、DNAおよびRNA合成を阻害するコリシンし、細胞の浸透圧環境を改変することに より、細胞敗血症を引き起こすコリシンM:コリシンBと同様に機能するペスチシンA 1 122:福孔形成パクテリオシンであるスタフィコクシン1580:未知の標的を介して 、RNA、DNAおよびタンパク質合成を開接的に阻害するブチリシン7423:ビオシ ンP1、すなわち、溶質輸送からの呼吸を脱糞役することにより、細胞を死滅させるバク テリオファージテールタンパク智に似たタンパク智:コリシンB2様の作用を有するピオ 30 シンAP41;または細胞内物質の週出を引き起こすホスホリパーゼであるメガシンA-216 (バクテリオシンの概要については、Konisky, 1982, Ann、 R ev. Microbiol, 36:125-144を参照):コリシンA (Plasm ids. a Practical Approach 1987. K. G. Hardy におけるPugsley、 A. P. およびOudega、 B. による" Methods for Studying Colicins and Their Plasmids")

[0129]

従って、一次エフェクター分子は、本明細書に記載した、または当業者には公知のあらゆ るバクテリオシンを含んでよいが、ただし、獣バクテリオシンは、バクテリオシン放出タ 40 ンパク質ではない。

[0130]

別の具体的な実施影態では、本発明の一次エフェクター分子は、腫瘍阻害酵素またはその 機能性断片である。腫瘍阻害酵素の何として、限定するものではないが、メチオナーゼ、 アスパラギナーゼ、リパーゼ、ホスホリパーゼ、プロテアーゼ、リポヌクレアーゼ、DN Aアーゼ、およびグリコシダーゼが挙げられる。好ましい実施彩態では、一次エフェクタ ー分子は、メチオナーゼである。

[0131]

本発明の一次エフェクター分子は、例えば、癌腫、黒色腫、リンパ腫、肉腫等の固形腫瘍 癌を治療または予防する上で有用である。

50

[0 1 3 2]

本発明は、一次エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、1つ 以上の一次エフェクター分子および場合に応じて、1つ以上の二次エフェクター分子をコ 下する核酸分子を提供する。本発明は、適したプロモーターに機能的に連結された本発 明のエフェクター分子をコードする核酸を提供する。場合に応じて、エフェクター分子を コードする核酸は、転写、翻訳、局在化、安定性等に関与するその他のエレメントに機能 的に連結することもできる。

[0133]

一次エフェクター分子をコードする核酸分子は、長さが約6~約100、000塩基対で ある。好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基対~約50.000塩基対である 10 。さらに好ましくは、この核酸分子は、長さが約20塩基材~約10,000塩基材であ る。さらにまた好ましくは、この核酸分子は、甚さが約20塩基対~約4、000塩基対 である。

[0134]

5.3. 一次エフェクター分子との共発現のための二次エフェクター分子 本発明の特定の実施形態では、一次エフェクター分子(例えば、TNFファミリーのメン パー、細胞傷害性ペプチドもしくはポリペプチド、抗血管新生因子、または腫瘍抑制酵素)は、場合に応じて、別の分子、すなわち、二次エフェクター分子と一緒に、細菌ベクタ - 内で共発視させる。二次エフェクター分子は、付加的治療価値を提供し、かつ/または 、周囲の環境へ(少なくとも1種の一次エフェクター分子、および、場合に応じて、1以 20 上の二次エフェクター分子を登現させる)修飾細菌ベクターの内容物の効出を促進する。 本明細書で用いる用語『付加的治療価値』とは、一次エフェクター分子が提供するもの以 外に、二次エフェクター分子が、腫瘍に対し、付加的もしくは相乗的、細胞分裂抑制性、 または細胞傷害性作用をもたらすことを指す。従って、二次エフェクター分子は、付加的 治療因子および/または放出因子として機能する。好ましくは、二次エフェクター分子は 、付加的治療因子もしくは放出因子(または両方)のいずれであっても、所望の認位、す なわち、腫瘍の部位で、優先的または特異的に活性化もしくは発現させる。特定の実施形 態では、二次エフェクター分子は、2つの機能を果たす、すなわち、細菌細胞内容物の故 出を促進する(例えば、細菌細胞溶解または準溶解を促進することにより)と同時に、治 寮価値を提供する(例えば、脂肪細胞に対する細胞毒性により)ことができる。特定の非 30 制限的実施形態では、二次エフェクター分子の細胞毒性は、患者の免疫系が介在しうる: 従って、このような二次エフェクター分子は、免疫調節剤として機能することができる。

[0135] 本明細書の特定の突旋形態では、本発明の弱端化腫瘍標的細菌ベクターは、抗腫瘍活体を 有する少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現させるように操作する。すなわち... 二次エフェクター分子の発現により、腫瘍または腫瘍細胞の死滅または成長の阻害が起こ

[0136]

300

二次エフェクター分子は、タンパク質性または核酸分子である。核酸分子は、二本線もし くは一本領DNAまたは二本鎖もしくは一本鎖RNA、ならびに、三重らせん核酸分子の 40 いずれでもよい。核酸分子は、リボザイム、またはアンチャンス核酸等として機能するこ とができる。

[0137]

アンチセンスヌクレオチドは、mRNAまたはDNA等の核酸に、配列特異的に結合する オリゴヌクレオチドである。相補的配列を有するmRNAに結合すると、アンチセンスは 、mRNAの翻訳を阻止する (例えば、米国特許第5. 168. 053:5. 190. 9 31; 5, 135, 917;および5, 087, 617号参照)。三重らせん分子とは、 二重らせんDNAと結合して、共直線性三重らせん分子を形成し、これにより、転写を阻 止する一本鎖DNAを意味する (例えば、米国特許第5, 176, 995号を参照)。 [0138]

リポザイムは、mRNA等のRNA装置を特異的に切断することにより、細胞成長もしく は発現を阻害または干渉するRNA分子である。RNA鎮の切断および/または連結に関 与するリボザイムとして、少なくとも5クラスのリボザイムが知られている。リボザイム は、任意のRNA転写産物を標的とすることができ、その転写産物を触媒的に切断するこ とができる (例えば、米国特許第5、272、262号:米国特許第5、144、019 号;および米国特許第5, 168, 053、5, 180, 818、5, 116, 742お よび5.093、246号を参照)。

[0139]

一次エフェクター分子についてすでに記載したように、二次エフェクター分子をコードま たは含有する核酸には、機能的連結で、選択したプロモーターを付与する、また、場合に 10 応じて、機能的連結で、転写、翻訳、局在化、安定性および/またはその値に参加する値 のエレメントを付与する。さらに、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子およ び内部リボソーム結合部位と同じプロモーターを用いて、または、一次エフェクター分子 とは異なるプロモーターを用いて、発現させることができる。

[0140]

二次エフェクター分子をコードする核酸分子は、長さが約6塩基対から約100.000 塩基対である。好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約50.000塩基対 である。より好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約10,000塩基対で ある。さらにより好ましくは、核酸分子の長さは、約20塩基対から約4、000塩基対 である。

[0 1 4 1]

下記の二次エフェクター分子をコードするエフェクター分子のヌクレオチド配列は、よく 知られている(GenBank参照)。二次エフェクター分子(この二次エフェクター分 子は、細胞傷害性もしくは細胞分裂抑制因子、またはその生物学的に活性の断片、変異体 もしくは誘導体である)をコードする核酸分子は、増幅 (例えば、PCR) 、ゲノムまた はcDNAライブラリーのプローブハイブリダイゼーション、発現ライブラリーの抗体ス クリーニング等の標準的方法により単離してもよいし、化学的に合成しても、または市販 の、もしくは他の供給源から得られたものでもよい。

[0 1 4 2]

本明細書に記載した用途で使用する核酸分子およびオリゴヌクレオチドは、当業者には公 39 知である任意の方法により合成することができる(例えば、国際公開WO93/0128 6、米国特許第5,218,088;5,175,269;および5,109,124号 参照)。アンチセンス試薬として使用するオリゴヌクレオチドおよびリボザイムの同定は 、当業者には公知の方法を含む。

[0 1 4 3]

3、1、 付加的治療価値をもたらす因子

本発明の特定の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子を発現し、かつ好 ましくは、サルモネラベクターである本発明の弱毒化腫瘍標的細菌ベクターは、抗腫瘍活 性を有する少なくとも1種の二次エフェクター分子を発現する。すなわち、該二次エフェ クター分子の発現により、腫瘍もしくは腫瘍細胞の死滅、またはそれらの成長の阻害、あ 40 るいは、腫瘍細胞の転移の阻害が起こり、これによって、一次エフェクター分子の細胞傷 害性または細胞分裂抑制作用を増強する。一実施形態では、二次エフェクター分子の頻響 への作用は、一次エフェクター分子の作用に付加的なものである。好ましい実施影響では この作用は、超付加的または相乗的である、すなわち、一次および二次エフェクター分 子を個別に投与した場合の作用を合わせたものより大きい。

[0 1 4 4]

特定の実施形態では、二次エフェクター分子は、タンパク質合成との干渉、または細胞周 期の破壊により細胞成長を阻害することによって、細胞に対し、細胞傷害性または細胞分 製抑制性である。このような物質は、例えば、rRNAもしくはりポ核タンパク質を切断 する、伸張因子を阻害する、mRNAを切断する、または、タンパク質合成を細胞が生存 50 できないレベルまで低下させるその他の機構により、作用すると考えられる。このような 二次エフェクター分子の例として、限定するものではないが、サポリン、リシン、アプリ ン、およびその他のタンパク質不活性化リボソーム(RIP)が挙げられる。

[0145]

別の実施影難では、二次エフェクター分子は、プロドラッグ変機酸衰またはこれをコード する核酸、すなわち、薬物の化学的性質を調節して、細胞傷害性薬剤を生成する酵素であ る。プロドラッグ変換酵素の例は、Pawelekらにより国際公開WO96/4023 8の第33頁の表2に一覧が記載されている。尚、この文献は、参照により本明細書に組 み入れる。国際公開WO96/40238はまた、このようなプロドラック変換酵素を含 む分泌融合タンパク質の生成方法も教示している。本発明によれば、プロドラッグ変換隊 10 素は、BRPのような放出因子と共発現させた場合、分泌タンパク質である必要はない(以下の第5.3.2節を参照)。具体的実施形態では、プロドラック変換酵素は、マイト マイシンCおよびボルフィロマイシン (Murrays, 1994. i. Pharma col. Exp. Therapeut. 270:645-649) に作用するシトク ロムp450 NADPHオキシドレダクターゼである。別の実施形態では、二次エフェ クター分子を、BRPのような放出因子と共発現させて、補因子(例えば、NADH、N ADPH、ATP等)の放出を起こすことにより、プロドラッグ変換酵素の活性を増強す る。この実施影響の別の態様では、二次エフェクター分子を、BRPのような放出因子と 共発現させて、活性化薬物(例えば、細菌細胞質または周辺細胞質内で活性化され、細菌 ベクターから放出された薬物)を放出させる。

[0146]

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、誘導性酸化窒素シンターゼ(NOS)また は内皮性酸化窒素シンターゼの阻害剤である。酸化窒素(NO)は、血管或長の関節およ び動候硬化に関与すると考えられている。NOは、酸化窒素シンターゼ(NOS)により Lーアルギニンから形成され、免疫、炎症および心臓血管応答を調節する。

[0147]

別の実施形態では、二次エフェクター分子は、癌塩伝子もしくは増殖因子(例えば、bFGF、int-2、hst-1/K-FGF、FGF-5、hst-2/FGF-6、FGF-8、または細胞受容体もしくはリガンド等の細胞増殖に関ウナるタシバク質の生成または活性を阻害することによって、細胞に対し、特性を有する、または細胞分裂を抑制する。阻害は、転写または翻鎖(リポポイムまたは三重らせんDNAである二次エフェクター分子により媒介される)のレベルで、あるいは、タンパク賃活性(ドミナントネガティブ突然変異体等の増殖因子経路の阻害剤である二次エフェクター分子により媒介される)のレベルで、あるいば、タンパク賃活性(ドミナントネガティブ突然変異体等の増殖因子経路の阻害剤である二次エフェクター分子により媒介される)のレベルで、行うことができる。

[0 1 4 8]

Freeman and Company、ニューヨーク、NY、第1版(1992)、 pp. 515-520 (本明細書に参照により組み入れる) に記載されている。腫瘍関 違抗原の他の例は、当業者には公知である。

[0 1 4 9]

別の実施影響では、二次エフェクター分子は、Flt-3リガンドまたはこれをコードす る核酸である。別の実施影態では、二次エフェクター分子は、BRPである。

[0 1 5 0]

具体的実施形態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子がTNFファミリ ーのメンバーのとき、TNFファミリーメンバーではない。別の具体的実施形態では、二 次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が抗血管新生因子のとき、抗血管新生因子 10 ではない。別の具体的実施影響では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が 細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチドのとき、細胞傷害性ペプチドまたはポリペプチド ではない。別の具体的実施影態では、二次エフェクター分子は、一次エフェクター分子が 腫瘍抑制酵素のとき、腫瘍抑制酵素ではない。

[0151]

5. 3. 2. 腫瘍環境への抗腫瘍エフェクター分子の放出を促進する因子

本発明の俺の実施形態では、少なくとも1種の一次エフェクター分子を発現し、かつ好ま しくは、サルモネラベクターである本発明の弱悪化腫瘍標的細菌ベクターは、少なくとも 1種の二次エフェクター分子を発現するが、数二次エフェクター分子は、細菌細胞膜を透 適可能にする、もしくは細胞外環境への細胞内成分の放出を増強する機能を果たし、これ 20 によって、一次および/または二次エフェクター分子の送達を増強する。このように、細 **函細胞を透過可能にする、または放出を増強する二次エフェクター分子は、「放出因子」** と呼ぶ。特定の実施形質では、放出因子は抗腫瘍活性も有するのが有利である。

[0 1 5 2]

本発明の細菌ベクターにより発現させる放出因子は、修飾弱毒化腫瘍標的細菌に内在性の ものでも、あるいは、外因性のもの(例えば、弱毒化腫瘍標的細菌にネイティブではない 核酸によりコードされたもの)でもよい。放出因子は、ブラスミドを含む核酸、または弱 毒化腫瘍標的細菌のゲノムに組み込まれた核酸により、コードすることができる。放出因 子は、一次エフェクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよい し、あるいは、別々の核酸またはプラスミドでコードしてもよい。放出因子は、二次エフ 30 エクター分子をコードする同じ核酸またはプラスミドでコードしてもよいし、あるいは、 別々の核酸またはブラスミドでコードしてもよい。一実施形態では、放出因子は、Omp 様タンパク質と融合させた一次エフェクター分子を含む融合タンパク質も発現する細胞内 で発現させる。この実施形態では、放出因子の共発現により、細胞周辺腔からの融合タン パク質の放出を増強することができる。

[0153]

好ましい実施形態では、このような因子は、バクテリオシン放出タンパク質、すなわち、 BRP (本明細書では、一般にBRPと呼ぶ)の1つである。本発明で用いるBRPは、 限定するものではないが、クロアシンDF13プラスミド、コリシンE1~E9プラスミ ドの1つ、もしくはコリシンA、NまたはDプラスミドを含む当業者には公知の任意の供 40 給源に由来するものでよい。好ましい実施形態では、BRPはクロアシンDF13(pC IoDF13 BRP) から成る。

[0154]

一般に、BRPは、45~52アミノ酸ペプチドであり、これは、初め、シグナルエンド ペプチダーゼによって切断されないシグナル範囲を含む前駆体分子(PreRRP)と1. て合成される。BRP活性は、少なくとも部分的に、デタージェント耐性外膜ホスホリバ ゼA(PIdA)により媒介されると考えられ、通常、外膜リン脂質の分解の増加に関 速している(BRFの概要については、van der Wals、1995、 FEMS Microbiology Review 17:381-399を参照されたい)。機構 に関して制限するわけではないが、BRPは、周辺細胞質成分の優先的放出を促進するが 50 、これより少ない過度での網胞質成分の放出も検出されている。適度に過剰発現させると BRPは額面膜を脆弱にし、細胞質成分の単溶解および高放出を誘導する。さらに、高 RPは、額高レベルで発現させると、このチンパク質が細面細胞溶解を引き起こし、高 放出により細胞内容物を送達することができると考えられる。この実施彩密で、BRP発 現成、BRP活性(例えば、細菌内容的放出)と相関すると考えられる。例えば、超 BRP活性により、実質的にすべての細菌の細菌細胞溶解を引き起こすとのよっな。例は、 足の上でを として定義される。BRPの発現しない対照細菌と対象して、過度のBRP活性は、細菌 の溶解を必要とせずに、細菌内容物の部分的または増加された放細菌の細菌溶解を引き起こすとの 完添形態では、BRPの通路とは、実質的にすべての細菌の細菌溶解を引き起こすとの が上、実質のは、まが、 、 2000にする。 の治解を必要とせずに、細菌内容物の部分的または増加された放細菌の細菌溶解を がして、 の治解を必要とせずに、細菌内容物の部分的または増加された放細菌の細菌溶解を でして がし、 、 2000にする、 、 2000にする、 ・ 3000にする、 ・ 3000にする、 ・ 3000にする、 ・ 3000にする、 ・ 3000にする、 ・ 300にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする。 ・ 30にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする、 ・ 30にする。 ・ 40にする。 40にする。

[0155]

本発明の具体的実施影響では、BRPタンパク質は、pCloDF13BRP突然変異体であり、その溶画機能は、そのタンパク質放出機能とは分離されているため、細菌溶解とした、タンパク質放出を増強する(vanderWal6、1998. App. Env. Microbiol. 64:392-398)。この実施影態により、細菌ペクターからのタンパク質放出が長くなると共に、ベクターの頻繁な投与の必要性が減少する。別の具体的実施影響では、本発明のBRPは、C末端を超くしたpCloDF13BRP 20であり、これは、タンパク質放出に加えて、細胞溶解を引き起こす(Lairinkら、1989. 1. Bacteriol. 171:2673-679)。

[0156]

本発明の別の実施形態では、増強された放出系は、ポーリンタンパク質の過剰発現を含む : 何えば、Sugawara, B.およびŊ i k aiao, H., 1992, J. Biot. Chem. 267;2507~11を参照のこと。

[0157]

[0158]

[0159]

あるいは、プロモーターは、T n 1 0 トランスポゾンの t e t プロモーター等の抗生物質 ∞

誘導プロモーターであることができる。好ましい実施形態では、tetプロモーターは、 単量体(singlemer)であり、該単量体は、ドキシサイクリンおよびアンヒドロ テトラサイクリン等のテトラサイクリンまたはその類似体の存在に、※無徳的に応答1... 遺伝学的に安定したオンーオフスイッチを提供する。別の実施形態では、tetプロモー ターは、多量体化 (例えば、3倍) する。このような多量体は、テトラサイクリンの存在 に数階的に応答し、エフェクター分子レベルの制御をより操作しうる系を提供する。次に 、本発明の弱촉化順導標的細菌で治療している被験者に、適した用量のテトラサイクリン を投与することにより、プロモーター活性を誘導する。tet誘導性発現系は、当初、シ ゾサッカロミセス・ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) (Faryarbl@Gatz, 1992. Current Genetics 21:3 10 45-349) および哺乳動物細胞 (LangおよびFeingold, 1996, G ene 168:169-171) 等の真核細胞系について記載されていたが、近年の研 究で、緬菌細胞までその適用性が広がっている。例えば、Stiegerら(1999、 Gene 226:243-252) は、tetプロモーターに機能的に連結させたte t誘導における、ホタル (firefly) ルシフェラーゼ遺伝子の80倍誘導を明らか にした。このプロモーターの利点は、非常に低レベルのテトラサイクリン、すなわち、抗 生物質活性に必要な用量の約1/10で、誘導される点である。

[0160]

5.4. 誘導体と類似体 本発明は、さらに、誘導体をコードまたは送達するように修飾された細菌ベクターを包含 20 する。この誘導体として、限定するものではないが、一次および/または二次エフェクタ 一分子、もしくはこれをコードする核酸の断片、類似体、あるいは変異型が挙げられる。 誘導体、類似体または変異型は、機能的に活性であり、例えば、全長の、野生型エフェク ター分子に関連する1以上の機能活性を示すことができる。一例として、所望の治療特性 を有するこのような誘導体、類似体または変異型を用いて、腫瘍成長または腫瘍細胞の分 敵(転移)を阻害することができる。エフェクター分子の誘導体または類似体は、本明細 書に記載したもの等、当業者には公知の方法により、所望の活性について試験することが できる。

[0 1 6 1]

特に、野生型エフェクター分子と同じ、もしくはこれより高い統賠基機能を有する分子を 30 提供する置換、付加(例えば、挿入)または欠失により、エフェクター分子コード配列を 改変することにより、変異型を作製することができる。例えば、本発明の変異型としては 、限定するものではないが、一次アミノ酸配列として、エフェクター分子のアミノ酸配列 の全部または一部を含むものが挙げられ、これには、機能的に同等のアミノ酸残基を配列 内で、サイレント変化を起こす残基で置換した、改変された配列がある。すなわち、改変 された配列は、少なくとも1の保存的置換を有する。

[0 1 6 2]

哺乳動物に由来する一次または二次エフェクターコード核酸のいずれかを改変して、当業 者には公知の方法により、細菌コドン使用煙度を用いることができる。好ましいコドン使 用頻度は、下記に例示されている:Current Protocols in Mole cular Biology, Green Publishing Associates Inc. . およびJohn Wiley & Sons, Inc. ニューヨーク, お LUZhangh, 1991. Gene 105:61-72.

[0 1 6 3]

具体的実施形態では、一次または二次エフェクター分子の誘導体、類似体または変異型は 、一次または二次エフェクター分子、またはその断片をコードするヌクレオチド配列とハ イブリダイズするヌクレオチド配列を含む。ここで、ハイブリダイゼーションは、ストリ ンジェントな条件下で、例えば、約45℃で6x 塩化ナトリウム /クエン酸ナトリウム (SSC) 中でフィルターに結合させたDNAとハイブリダイズさせた後、約50~65 むで0.2 x SSC/0、1%SDS中で1回以上洗浄することにより行う。または、 高度にストリンジェントな条件下で、例えば、約45℃で6x SSC中でフィルターに 結合させた核酸とハイブリダイズさせた後、約68℃で0.1 x SSC/0.2%SD S中で1回以上洗浄することにより実施する。あるいは、当業者には公知の他のストリン ジェントな条件下で実施することができる(例えば、Ausubel, F. M. ら、編 1989. Current Protocols in Molecular Biol ogy, Vol. I. Green Publishing Associates, I nc., およびJohn Wiley & Sons, Inc. ニューヨーク、page s 6, 3, 1~6, 3, 6 \$ \$ \$ \$ \$ \$ \$ 2, 10, 3) , [0164]

一次もしくは二次エフェクター分子の誘導体または類似体としては、限定するものではな 10 いが、一次もしくは二次エフェクター分子またはその断片に実質的に相同的な領域を含む 分子(例えば、様々な実施影襲における、挿入または欠失を一切含まない同じサイズのア ミノ酸配列に対して、あるいは、アラインメントが当業者には公知のコンピュータ相同性 プログラムにより実施されたアラインメント済配列と比較して、少なくとも60%または 70%または80%または90%または95%問一帳)、あるいは、そのコード核酸が、 高ストリンジェンシー、中ストリンジェンシーまたは低ストリンジェンシー条件下で、エ フェクター分子タンパク質エフェクター分子コード配列にハイブリダイズすることができ る分子が挙げられる。 [0165]

例えば、一次エフェクター分子の配列と他の既知配列間の、2つのアミノ酸配列または2 20 つの核酸の同一性百分率を決定するために、最適な比較目的に合わせて配列をアラインメ ントする (例えば、第1アミノ酸または核酸配列の配列にギャップを導入して、第2アミ ノ酸または核酸配列との最適アラインメントを達成することができる)。次に、対応する アミノ酸位置またはヌクレオチド位置にあるアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する 。第1配列における位置が、第2配列における対応位置と同じアミノ酸残基またはメクレ オチドにより占められている場合には、分子は、その位置で同一である。2つの配列間の 同一性百分率は、配列が共有する同一位質の数の関数である(すなわち、%同一性=同一 位置の数#/位置の総数# (例えば、重複位置) ×100)。一実施影態では、2つの配 列は、同じ長さである。

[0166] 2 つの配列間の同一性百分率は、数学アルゴリズムを用いて達成することができる。 2 つ の配列の比較に用いられる数学アルゴリズムの好ましい非制限的例は、Kariinおよ UAltschul, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズム (KarlinおよびAltschul, 1 993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-587 7に記載されているように修正された)である。このようをアルゴリズムは、Alise halb, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-4100NBLAS TおよびXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索を、 NBLASTプログラム、スコア=100、語長=12を用いて実施することにより、本 発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検 40 索を、XBLASTプログラム、スコア=50、語長=3を用いて実施することにより、 本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較目的のためにギ ヤップアラインメントを得るためには、Altschul6、1997、 Nuclei c Acids Res. 25:3389-3402に記載されているように、ギャップ BLASTを用いることができる。あるいは、PSI-Blastを用いて、分子間の距 離関係を検出する反復検索を実施してもよい(同上)。BLAST、ギャップBLAST 、およびPSI-BIastプログラムを用いる場合には、それぞれのプログラム(例え は、XBLASTおよびNBLAST) のデフォルトパラメーターを用いることができる 。 http://www.ncbi.nlm.nih,gov,を参照のこと。配列の比 較に用いられる数学アルゴリズムの別の好ましい非嗣隔的例は、MyersおよびMil 50

1 e r のアルゴリズム、 CABIOS (1989) である。このようなアルゴリズムは 、GCG配列アラインメントソフトウエアパッケージの一部である、ALIGNプログラ ム(バージョン 2. 0)に組み込まれている。ALIGNプログラムを使用してアミノ酸 配列を比較する場合には、PAM120重量残基表、12のギャップ長ペナルティー、お よび、4のギャップペナルティーを用いることができる。配列分析のためのさらなるアル ゴリズムは、当業者には公知であり、次のものが挙げられる: TorellisおよびR obotti, 1994. Comput. Appl. Biosci., 10:3-5に記載されたADVANCEおよびADAM; PearsonおよびLipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8に記載さ れたFASTA。FASTAでは、ktupが、検索の総数性および速度を設定する制御 10 オプションである。ktup=2であれば、比較している2つの配列における類似領域は 、アラインメント済残基対を調べることによりみつけられる。また、ktup=1であれ ば、単一のアラインメント満アミノ酸を調べる。ktupは、タンパク質配列の場合は、 2または1に、DNA配列の場合は、1~6に設定することができる。k t u p が指定さ れていない場合には、デフォルトは、タンパク質については2、DNAについては6であ る。FASTAパラメターのさらに詳細な説明については、 http://bioweb. pasteur. fr/docs/man/fasta.

1. html#sect2

を参照されたい。尚、この内容は、本明細書に参照により組み入れる。 [0167]

あるいは、タンパク質配列アラインメントは、Higgins6、1996, Meth ods Enzymol. 266:383-402に記載されているCLUSTAL W アルゴリズムを用いて実施することができる。 [0168]

2つの配列間の同一性百分率は、ギャップのあるなしに拘わらず、前途したものと同様の 技法を用いて決定することができる。同一性百分率を計算する際には、正確に同じものだ けを計数する。

[0169] 一次エフェクター分子もしくは二次エフェクター分子、またはその誘導体または類似体は 、当業者には公知の様々な方法により生成することができる。これらを生成するための様 30 作は、核酸またはタンパク質レベルで行うことができる。例えば、エフェクター分子をコ ードする、クローン化されたエフェクター分子コード配列は、当業者には公知の多数の戦 略のいずれかによって修飾することが可能である(Sambrookら、1989、 M olecular Cloning, A Laboratory Mannual, 第2 版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Col d Spring Harbor、ニューヨーク)。該配列は、制限エンドスクレアーゼ を用いて、適切な部位で知斷し、次いで、所望であれば、さらに酵素による修飾を施し、 単準した後、in vitroで連結することができる。一次または二次エフェクター分 子の誘導体または類似体をコードする修飾エフェクター分子の生成の際、所望の一次また は二次エフェクター分子活性がコードされるエフェクター分子コード配列領域において、 修飾エフェクター分子コード配列が、翻訳停止シグナルにより中断されない状態で、ネイ ティブタンパク質と同じ翻訳リーディングフレーム内に残ることを確実にするよう注意し

[0 1 7 0] さらに、エフェクター分子をコードする核酸をin vitroまたはin vivoで突 然変異させることにより、翻訳、開始、および/または終結配列を形成および/または破 壊する、あるいは、コード領域に変異を発生させる、および/または新しい制限エンドヌ クレアーゼ部位を形成する、もしくは既存のものを破壊することにより、in vitr o 修飾をさらに促進することができる。好ましい具体的実施形態では、エフェクター分子 コード核酸を突然変異させることにより、例えば、さらに強力な変異型を生成する。当業 50

なければならない。

者には公知の任意の突然変異誘発技法を用いることができ、この技法には、限定するもの ではないが、下記のものが挙げられる:化学的突然変異誘発、in vitro部位指定 突然変異誘発(Hutchinsonら、1978, J. Biol, Chem. 25 3:6551)、TAB (登録商標) リンカー (Pharmacia) の使用、突然変異 を含むプライマーを用いるPCR等。好ましい実施形態では、エフェクター分子の1以上 の推定非必須アミノ酸残基の位置において、保存的アミノ酸置換物を作製する。「保存的 アミノ酸置換物」とは、アミノ酸残基を、類似した電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸残 基で置換したものを意味する。類似した電荷を帯びた側鎖を有するアミノ酸硝基のファミ リーは、当業界で定義されている。これらのファミリーとしては、下記のものが挙げられ る:塩基性側鎖 (例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン) 、酸性側鎖 (例えば、アス 10 パラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グル タミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖 (何えば、アラニン 、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリブ トファン)、8枝分かれ側鎖(例えば、トレオニン、パリン、イソロイシン)、および芳 香族側鎖 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) をそれ ぞれ有するアミノ酸。あるいは、突然変異は、例えば、飽和突然変異誘発により、コード 配列の全部または部分に沿って、ランダムに導入することができ、こうして得られた突然 変異体を生物学的活性についてスクリーニングすることにより、活性を保持する突然変異 体を同定することができる。突然変異誘発の後、コードタンパク質を発現させ、該タンパ ク質の活性を決定することができる。 [0171]

別の実施形態では、プロテアーゼ切断部位を含むように、本発明のエフェクター分子また

は融合タンパク質を流染する。 [0 1 7 2]

5.5. 融合タンパク質

特定の実施形態では、本発明は、融合タンバク質(例えば、側のタンパク質と共有結合)。 ている)として構築される一次または二次エフェクター分子を提供する。本祭嗣は、この ような融合タンパク質をコードする核酸を提供する。本発明の特定の実施形態では、融合 タンパク質をコードする核酸を、適したプロモーターに機能的に連結する。

[0 1 7 3] 特定の実施形態では、エフェクター分子は、別のタンパク質のアミノ酸配列とのペプチド 結合を介して、そのアミノーまたはカルボキシー末端に結合したエフェクター分子もしく はその断片(好ましくは、設エフェクター分子の少なくともドメインもしくはモチーフ、 または、該エフェクター分子の少なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なく とも50、少なくとも75、もしくは少なくとも100のアミノ酔からなる)を合かキメ ラタンパク質または融合タンパク質として構築される。特定の実施形態では、融合物は、 機能的に活性である異種ポリペプチドまたはその断片の少なくとも2、少なくとも6、少 なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも50、少なくとも75、も しくは少なくとも100の連続したアミノ酸を含む。一実施形態では、このようなキメラ タンパク質または融合タンパク質は、別のタンパク質のコード配列にフレーム内結合した 40 一次エフェクター分子をコードする核酸(例えば、TNFコード配列、抗血管新生因子コ - ド配列、腫瘍抑制酵素コード配列、もしくは細胞傷害性ポリペプチドコード配列) の組 換え発現により生成する。このようなキメラタンパク質は、当業者には公知の方法により 、適正なコードフレーム内で、所望のアミノ酸配列をコードする適切な核酸配列を買いた 連絡した後、当業者には公知の方法で最適の発現連搬体にキメラ産物を発現することによ り、作製することができる。任意の異種ポリペプチドコード配列と融合させたエフェクタ 一分子をコードする核酸部分を含むキメラ核酸を構築してもよい。具体的実施形態は、少 なくとも5、少なくとも10、少なくとも25、少なくとも50、もしくは少なくとも1 00のアミノ酸からなる一次または二次エフェクター分子の断片、あるいは、全長一次ま たは二次エフェクター分子の1以上の機能活性を示す断片を含むキメラタンパク質に関す 50 8. [0174]

具体的寒瘍形態では、融合タンパク質は、ヘキサヒスチジンタグ等のアフィニティータグ、、または精製、単難、同定もしくは発現アッセイで用いることができるその他のアフィニティータグを含む。別の具体的突痛形態では、融合タンパク質は、メタルプロテァーゼまたはモリン切断部位等のプロテアーゼ部位を含む。この実績影態では、無難部は資計をかが好ましい場合もある。いくつかの実態形態では、エフェクをフ分は、〇m p様タンパク質に指令とある。いくつかの実態形態では、エフェクをフ分け、〇m p様タンパク質に持ちている。といくのかの実態形態では、エフェクをフ分け、〇m p様タンパク質といる。といくのかの実態形態では、エフェクを一分子は、〇m p様タンパク質をして、といくの、これとの組合せ、以下の第3.1節、〇m 10 p様クンパク質の定義を参照)との融合タンパク質として構築する。

好ましい実施影繁では、本発明のエフェクター分子(一次または二次)は、外膜タンパク 質(Om p様タンパク質)を含む融合タンパク質として発現させる。細菌外膜タンパク質 は、細菌外膜の膜内在性タンパク質であり、多重膜貫通 (multiple membr ane-spanning) ドメインを育し、多くの場合、1以上の脂質成分に結合して いる。外膜タンパク質は、初め、タンパク質を膜に向かわせるアミノ末端シグナルペプチ ドを有する前駆体の形態で発現し、その際に、シグナルペプチドをシグナルペプチダーゼ により切断して、成熟タンパク質を生成する。一実施形態では、エフェクター分子は、O mp様タンパク質との融合タンパク質として発現させる。この実施形態では、一次エフェ 20 クター分子は、細菌の外膜への送達が増強されている。機構に関して制限するわけではな いが、本発明者は、Cmp様タンパク質が、外膜に対するエフェクター分子のアンカーま たは連結鎖(tetheェ)として働く、あるいは、細菌外膜にタンパク質を局在化させ る役割を果たすと考える。一実施影能では、Omp織タンパク質とのエフェクター分子と の融合を用いて、周辺細胞質へのエフェクター分子の局在化を増強する。別の実施形態で は、Omp様タンパク質とエフェクター分子の融合を用いて、エフェクター分子の放出を 増強する。具体的実施形態では、Omp様タンパク質は、OmpA、OmpB、OmpC 、OmpD、OmpE、OmpF、OmpT、ボーリン様タンパク質、PhoA、Pho E、lamB、βラクタマーゼ、エンテロトキシン、プロテインA、エンドグルカナーゼ 、ペプチドグリカン関連リポタンパク質 (PAL)、FepA、FhaA、NmpA、N 30 mpB、NmpC、もしくは主要な外膜リポタンパク質(LPP等)の少なくとも一部で ある。本発明の特定の実施形態では、シグナル配列は、疎水性を高めて構築する(例えば 、疎水性アミノ酸(例えば、ロイシン)への、シグナル関列内のアミノ酸の挿入または闇

1011(0] 本発明の別の実革形態では、本発明の融合タンパク質は、タンパク質分解切断部位を含む。タンパク質分解切断部位は、エフェクター分子に内在的または〇mg様タンパク質に内を的である、あるいは、タンパク質分解切断部位を融合タンパク質中に構築してもよい。

機による)。実施例については、以下の第7、1~7、4節を参照のこと。

る構造エレメントを含むハイブリッドOmpである。 【0177】

上記実施形態の態様例では、Omp様タンパク質はOmpAである。具体的Omp様タンパク質の構造的立体配置に図慮しながら、OmpA様練治タンパク質の構築に用いた同じ 原理を他ののmp様タンパク質に適用することができる。

[0178]

例えば、ネイティブ〇mp Aタンパク質は、芯タンパク質の170 アミノ酸 N末端 ドメイン内に30のアンチパラレル戦員 遊り録を含む。 膜貫通ドメインの各対の間には、 膜貫通ドメインの海入方向に応じて、細胞外または細胞内ループがある。 C末端ドメインは、155アミノ酸からなり、これらは、細胞内に位置し、恐らく、 細胞周辺腔を占めるペプチグリカンと接触していると思われる。 Omp A級をタンパク質の生成を促進さる発現ペ 59

タターが作駅されている。例えば、Hobomち(1995, Dev, Biol、Strand、 S4:255-262)は、OmpAオープンリーディングフレームを含むベクターを開発しており、これは、第3または第4細胞外ループをコードする配列内にリンカーが挿入されている。該ループにより、遊択した異種タンパク質のフレーム内挿入が可能になる。

[0179] 本発卵の一実施影響では、一次エフェクター分子を含む○mpA融合タンパク質部分は、周辺細胞質において発現を増強させた。該実施影響の一態様では、融合タンパク質は、成熟的に、シグナル配列、または、一水エフェクター分子もN末端に位置する○mpAの少なくとも1の映貫海ドメインが続くシグナル配列を含む。シグナル配列は切断され、成熟 10 シッパク質から欠失している。上記末施影響の別の態様では、一次エフェクター分子分入子は、〇mpA融合タンパク質のN末端にあるため、融合タンパク質が安定している限り、便用した○mpAの販責測ドメインの数は、一次エフェクター分子の位置決定にとって重合した○mpAの販責測ドメインの数は、一次エフェクター分子の位置決テは、○mpAのNおよびて末端ドメインの間に配置し、これによって、可容性周辺細胞質タンパク質は、「のMpAのNおよびて末端ドメインの間に配置し、これによって、可容性周辺細胞質タンパク質は、同辺細胞質内の深端影響の特定の意様では、同辺細胞質ー次エフェクター分子を発現する細菌ペクタターは、BPRも共発現することにより、細菌細胞からのエフェクター分子の放出を増強する。この実施影響の特定の意様では、周辺細胞質ー次エフェクター分子の放出を増強する。この実施影響の特定の意様では、周辺細胞質ー次エフェクター分子の放出を増強する。この実施影響の特定の意様では、周辺細胞質ー次エフェクター分子の放出を増強する。この実施影響の特定の意様では、周辺細胞質ー次エフェクター分子の放出を増強する。

[0180]

本発卵の別の実施形態では、一次エフェクター分子を含むのpA融合タンパク質部分は、細胞外側面表面にある。設実施形態象の一態機では、融合タンパク質は、一次エフェクター分子の小原体では、融合タンパク質は、一次エフェクター分子の小原体では、融合タンパク質は、上記実施形態での開発して、大型の一般では、一次エフェクター分子をのmpAの2つの細胞外ループ間に配置して、細胞外表面に位置するエフェクター分子をつかり、1分質の発現プラスミドを提供する。例えば、下rc(1pp)のmpAと称されるプラスミドは、切断型のmpA機員通配別に融合したは、てrc(1pp)のmpAと称されるプラスミドは、切断型のmpA機員通配別に融合したは、Cプロモーター駆動リポリタンパク質(1pp)アンカー配列を含む。別の例として、上記プラスミドは、TrcのmpAと称し、は下cプロモーター駆動のmpAコードシグナル配列を含む。このようなプラスミドは、本発明の1以上のエフェクター 20分子をコードシグナル配列を含むよっに構造するとができる。

[0181]

場合に応じて、エフェクター分子は、腫瘍に豊富に存在するメタロプロテアーゼまたは七 リンプロテアーゼの共適切断部位に先行されるか、もしくは該部位と傳染させることによ り、腫瘍環境にエフェクター分子の放出を起こす。一次エフェクター分子が、プロテアー ゼ切断部位に先行されるか、隣接させるかは、それぞれ、融合タンパク質内の末端に位置 するか、内部に位置するかによる。

[0 1 8 2]

同様の融合タンパク質は、0mp Aに関して資産した戦略を使用し、任意の0mp 様タンパク質と構築することができる。このような融合タンパク質の構築に防じて、当業者には 40 明らかなように、ユフェクター分子に融合させる0mp 様タンパク質部分の遭毀は、エフェクター分子の発現のために望ましい位置(例よば、周辺細胞質に、細胞外に、膜に結合して等)に応じて異なる。一次エフェクター分子に関して、本明細畫に記載したこのようなタンパク質構築は、二次エフェクター分子に対しても適切である。

[0183]

好ましい実施形態では、エフェクター分子はフェリーペプチドに融合させる。融合タンパ ク質に用いられるフェリーペプチドは、その生成または導入の拡散範囲(diffusi on limits) 内で、実質的にあらゆる細胞へ、目的とするポリペプチドまたはペ プチドの送達を促進することが明らかにされている(例えば、Bayley、 1999 Nature Biotechnology 17:1066-1067; Ferna

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N... 9/17/2007

ndez 6, 1998, Nature Biotechnology 16:418-4 20; BLODerossib, 1998, Trends Cell Biol, 8:8 4-87)。従って、弱毒化腫瘍標的細菌が、フェリーペプチドおよびエフェクター分子 を含む融合タンパク質を発現するように、該細菌を操作することにより、エフェクター分 子が腫瘍細胞によって取り込まれる能力を増強する。具体的実施形態では、弱毒化腫瘍標 的細菌は、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む融合タンパク質をコードする 核酸を発現するように操作する。別の実施形態では、弱素化腫瘍癌的細菌は、フェリーベ プチドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸 分子を発現するように操作する。これらの実施形態によれば、エフェクター分子は、一次 または二次エフェクター分子でよい。フェリーペプチドの例として、限定するものではな 10 いが、HIV TATタンパク質に由来するペプチド、アンテナペディアホメオドメイン (ペネトラキシン) 、カボジ織維芽細胞増殖因子 (FGF) 膜移行性配列 (MTS) 、単 縫ヘルペスウイルスVP22、ポリヒスタジン (例えば、ヘキサヒスタジン;6日)、ポ リリシン (例えば、ヘキサリシン:6 K) およびポリアルギニン (例えば、ヘキサアルギ ニン: 6R) (例えば、Blankeら、1996, Proc. Natl. Acad . Sci. USA 93:8437-8442) が挙げられる。 [0184]

(50)

別の好ましい実施形態では、融合タンパク質は、シグナルペプチド、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む。この実施形態の具体的影性では、弱率化腫瘍標的細菌は、シグナル配別、フェリーペプチドおよびエフェクター分子を含む「以上の融合シパイク質 20 をコードする1以上の核酸分子を発現するように操作する。この意様によれば、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。 【0185】

即の好ましい実施彩源では、融合タンパク質は、弱垂化腫瘍解的細菌により固形腫瘍癌に 送達するための、シクナルペプチド、タンパク質分解切断部位、フェリーペプチドおよび エフェクター分子を含む。具体的突施形態では、弱端化腫瘍候的細菌は、シグナル配列、 タンパク質分解切断部位、フェリーペプナドおよびエフェクター分子を含む1以上の融合 タンパク質つコードする1以上の核酸子を発現するように操作する。この懸様によれば 、エフェクター分子は、一次または二次エフェクター分子でよい。 「01861」

非制限的例として、コリシン活性は、HIV TAT、単純ヘルペスウイルスVP22、 アンテナペディア、6 H、6 K および6 Rに由来する取り込み用ペプチドを添加すること により増強することができる。融合は、C 末端、N 末端または内部のいずれにおいても 能である。内部での融合は、N 末端シブナル配列切断ペプチドの後に融合が続く場合、特 に好ましい。融合タンパク質は、さらに、OmpA等のN末端シグナル配列、またはhI yA等のC 末端シブナル配列を含む。 【0 1 8 7 】

101871 新ましい実施影像では、エフェクター分子を毒素の透過部分に融合させる。様々な毒素が、自己透達能力を有することで知られており、その際、毒素の一部分が、事業の第2部分の透達因子として働く。例はは、Ballardら(1996、Proc、Natl. 40 Acad. Sci. USA 93:12531-12534)は、哺乳動物細胞の細胞質ソルコンパートメントへの兼死因子(LF)および停聴因子のエントリーを媒介する接触(4anthraz)のサーバ、LFの砂糖型(LFa, 255下2)で発掘うるのカンパク質融合物のエントリーも維かするものを除る、LFa, またはその他の乗業系(限定するものではないが、ジフテリア毒素A舗残塞1-193等)(Blankeら、1996、Froc、Natl. Acad/Sci. USA 93:8437-8442)、コレラ毒素、ベロ毒素、大助電熱水変形度や素(LT)、大路菌熱変化性毒素で(ST)、腸合血素、メンチ型ト・細胞薬氏性毒素と、2000年の素素、CST)、腸合血素、メンチ型ト・3000年の素素、CST)、腸合血素、メンチ型ト・3000年の場合素をは、1996、Proc、Natlankesをは、1996、Proc Natlankesをは、1996、Proc Natlankesをは、1996、Proc Natlankesをは、1996、Proc Natlankesをは、1996、Proc Natlankesをは、1996、Proc Natlankesをは、1996、Proc Natlankesをは、1996、P

することができる(詳しくは、例えば、O'BrienおよびHolmes, 1996. Protein toxins of Escherichia coli and Salmonetla. Cellular and Molecular Biology, Neidhardtb (編). ASM Press. ワシントンD. C., pp278-2802参照)。具体的実施形態では、一次エフェクター分子を毒素の送達部分に融合する。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子を毒素の送達部分に融合する。別の具体的実施形態では、二次エフェクター分子を毒素の送達部分に融合する。【01881

細菌内で発現ませるための融合タンパク質の福蘇は、当業者には公知であり、このような 方法は、本発明の範囲に含まれる(例えば、Makrides, S., 1996, M icrobiol. Revs 60:512-538を参照。尚、この文献は、参照によ 10 り本明濶書にその全文を組み入れる)。 [0189]

5. 6 発現運搬体

本発明は1以上の一次エフェクター分子および1以上の任意の二次エフェクター分子をコ ードするよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌を提供する。本発明はプラスミドまたはトラ ンスフェクト可能な核酸にコードされるエフェクター分子を含んでなる弱悪化腫瘍種的細 菌を提供する。本発明の好ましい実施影態では、弱毒化腫瘍標的細菌はサルモネラ菌であ る。サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌において2以上のエフェクター分子(例えば 、一次または二次)が発現される場合には、エフェクター分子は同一のプラスミドもしく は核酸にコードされていてもよいし、または2以上のプラスミドもしくは核酸分子にコー 20 どされていてもよい。本発明はまた細菌ゲノムに組み込まれた綾鰺分子にコードされるエ フェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も提供する。組み込まれるエフェクター 分子はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍態的細菌の内生のものであってもよいし、またはエ フェクター分子をコードする核酸分子が弱毒化腫瘍繰的細菌のゲノムに組み込まれるよう に、弱毒化腫瘍標的細菌に導入してもよい(例えば、プラスミド、トランスフェクト可能 な核酸、トランスポゾンなどのようなエフェクター分子をコードする核酸の導入による) 。本発明の好ましい実施形態では、弱毒化腫瘍標的繃蘭はサルモネラ菌である。本発明は 適当なプロモーターに機能的に連結されている、エフェクター分子をコードする核酸分子 を提供する。エフェクター分子をコードする核酸分子に機能的に連結されているプロモー ターは同種(すなわち、天然のもの)または異績(すなわち、エフェクター分子をコード 30 する核酸分子に対して天然のものでない)であってもよい。

[0 1 9 0]

本発明のエフェクター分子をコードするヌクレオチド配列またはその機能的に活性な類似 体もしくは断片もしくはその他の誘導体は、挿入されたタンパク質をコードする配列の転 写および翻訳のための必須エレメントを含む適当な祭現運機体、例えばプラスミドに挿入 してもよい。必須転写および翻訳シグナルはエフェクター分子および/またはそのフラン キング領域によって供給されてもよい。あるいは、発現運搬体は、DNA操作の分野で公 知の種々の方法の1つを用いて、所望のタンパク質をコードする構造DNA配列を、好適 な翻訳関始および終結シグナルとともに、機能性プロモーターと機能可能な読み取り相で 挿入することによって構築する。機論として、Sambrookら、 1989、 Mol 40 ecular Biology: A Laboratory Manual, Cold S pring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubelb, 1995. Current Protocols in Molec ular Biology, Greene Publishing, New York, NYを参照。これらの方法はin vitro組換えDNAおよび合成技術およびin v i v o 組換え (遺伝子組換え) を含み得る。本発明は適当なプロモーターに機能的に連結 されている、エフェクター分子をコードする核酸分子を提供する。 [0 1 9 1]

本発明はまた1以上の融合タンパク質および1以上の任意のエフェクター分子をコードするよう改変された弱毒化腫瘍縁的細菌も提供する。本発明はプラスミドまたはトランスフ 50

エクト可能な核酸にコードされる融合タンバク質を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌を提供 する。サルモネラ南などの弱奏化腫無極的細菌において2以上の融合タンパク質および/ またはエフェクター分子 (例えば、一次または二次) が発現される場合には、融合タンバ ク質および/もしくはエフェクター分子は同一のプラスミドもしくは核酸にコードされて いてもよいし、または2以上のブラスミドもしくは核酸にコードされていてもよい。本祭 明はまた獨商ゲノムに組み込まれた核酸にコードされる融合タンパク質を含んでなる弱毒 化腫瘍標的細菌も提供する。本祭明はまた適当なプロモーターに機能的に連結されている 融合タンパク質をコードする核酸分子も提供する。本発明の融合タンパク質をコードする ヌクレオチド配列は、挿入されたタンパク質をコードする配列の転写および翻訳のための 必須エレメントを含む適当な発現運搬体、例えばプラスミドに挿入してもよい。

[0 1 9 2]

本発明のある特定の実施形態では、本発明の発現運搬体はプラスミドである。当業者には 多数の好適なプラスミドが知られており、また市販のものを入手して本発明の組換え機築 物を作製することもできる。

[0193]

かかる市販のプラスミドとしては、例えば、pKK223-3 (Pharmacia F ine Chemicals, Uppsala, Sweden) \$\$\$UGEM1 (Pr omega Biotec, Madison, WI, USA) が挙げられる。これちの pBR322 「基幹」部分を適当なプロモーターおよび発現されるべき構造配列と組み合 わせる。 pBR322は低コピー数プラスミドであると考えられている。高レベルの発現 20 を望む場合には、プラスミドは高コピー数プラスミド、例えば、pUC基幹を含むプラス ミドであってもよい。 p.U.C.プラスミドとしては、限定されるものではないが、 p.U.C.1 9 (何えば、Yanisch-Perron6, 1985, Gene 33:103-119参照) およびのBluescript (Stratagene) が挙げられる。

[0 1 9 4]

以下のプラスミドが例として挙げられ、本祭明の方法とともに使用できる。細菌性:pB s, phagescript, phiX174, phluescriptSK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia)。pBR322「基幹」を含む市販のプラスミド、例えば、pK 30 K223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) およびGEM1 (Promega Biotec, Madison, W USA)も使用できる。これらを適当なプロモーターおよび発現されるべき機造配 列と組み合わせる。 p C E T 、 p T S (本明細書の第6節に記載されるような)。

[0 1 9 5]

本発明の特定の実施影響では、エフェクター分子をコードするプラスミドは本明細書の築 6節に記載されるpTS-TNF-aプラスミド、pTS-BRPプラスミド、またはp TS-BRPTNF-αプラスミドである。

[0196]

本発明の特定の実施形態では、OmpAシグナル配列および一次エフェクタータンパク質 40 を含んでなる、細胞膜周辺腔への分泌のための本発明の融合タンパク質はプラスミドゥー N-III-ompA-Hindにコードされており、これは一次エフェクター分子のコ ード配列がクローニングされ得るリンカー配列の上流にompAシグナル配列をコードす るDNA配列を含む。好ましい特定の実施形態では、pIN-III-ompA-Hin dベクターのlac誘導性プロモーターをpepTまたはtetプロモーターで置換する (Rentier-Delrues (1988), Nac. Acids Res. 16 :8726參照)。 [0 1 9 7]

本発明はまたエフェクター分子のトランスポゾン媒介性染色体組込みを提供する。本発明 の方法には、エフェクター分子をコードする核酸がトランスポプンカセット中に機築され 50 得る限り、当技術分野で公知のいずれのトランスポゾンプラスミドを用いてもよい。例えば、本発明はトランスポゾンまたはミニトランスポゾンおよびMCSを含んでなるトランスポゾンプラスミドを提供する。 スポゾンプラスミドを提供する。

[0198]

本発明のある実施形態では、本発明のプラスミドはトランスポゾンプラスミドである、すなわち、注目されるエフェクター分子をコードする配列が明入されたトランスポゾンを含み、ためたでなる。トランスポゾンでラスミドでもの深まで、エフェクター分子を大きな形が、サランスポゾンをかりを含み、このカリ重をコードする報節をインスにより、セスポリンカセットを融合といれた関連をは、サランスポゾンカセットが調査がノムに組み込まれる。このようにして、テランスポゾンガースによりそのカセットが調査がノムに組み込まれる。エフェクター分子のコード配列はプロデースによりその上で、上記列は対していて、場合には、満分でカーで表す。というによってなされる。トラツスポゾンが挿入地で、カーによってなされる。トラツスポゾンが挿入とれた調査のコロニーを本発明の要件に一致する発現レベルについて、例え、腰藤の細胞振香性、静止、退縮を増強するのに十分なレベルのサイトカインを発現するものをスタリーニンがする。

0199

ある実施形態では、トランスポゾンブラスミドがトランスポゾンの他に、トランスポゾン の運位区復配列の外側に、トランスポゾンとともに運ばれることなく、トランスポゾンの 棚面ゲノムへの個人を触媒するトランスポザーゼ運伝子を含んでなり、そのようにして安 定なトランスポゾン挿入を有する棚面面株を作数する。

[0200]

[0 2 0 1]

ある実施形態では、必要に応じてプラスミドを操作し、プラスミドにコードされるアンビ シリン開性特性を用いて所鑑の精楽物を有するクローンを選抜した後、プラスミドの喪失 によって抗生物質選抜が除去され、ヒト忌者への投与のための染色体トランスポゾン挿入 部分を有する園標を選択する (例えば、遷択培地にプレーティングすることによる)。

[0 2 0 2]

もう1つの特定の実施形態では、振約特異性が変化したトランスポザーゼ違伝子およびブ ロモーターのないserC違伝子のコード配列およびMCSを含むミニトランスポソンを 含んでなるプラスミドpTSを用いる。もう1つの特定の実施形銀では、線的特異性が変 化したトランスポザーゼ遺伝子およびプロモーターのないserC違伝子のコード配列、 およびアルキル化剤誘導性バクテリオシン放出因子およびMCSを含むミニトランスポゾ ンを含んでなるプラスミドpTS-BRPを用いる。

[0203]

好ましい実施影態では、トランスポゾン媒介性染色体組込み体の遷抜のためのトランスポ ゾンプラスミドは以下を含んでなる:

a) トランスポゾン挿入配列の外側に (例えば、トランスポゾンカセットの外側に) 位置 50

するトランスポゾン切り出しおよび組込みのためのトランスポザーゼ遺伝子:

- b)細菌菌株において欠失した選択遺伝子 (例えば、serC) に相当する野生型コード 配列ならびにリポソーム結合部位および野生型遺伝子のターミネーター(ただし、プロモ ーターは欠く)。この配列は好ましくは左側のTN10トランスポゾン挿入配列の直後に 位置する:
- c) 所望により、右側および左側の挿入腕列の間が放出境強核酸 (例えば、BRP) をコ ードする核酸配列である: ならびに
- d) 右側および左側の挿入配列の間に位置し、プラスミド内に唯一の制限部位を複数含む 、エフェクター分子の組込みのためのマルチブルクローニング部位(MCS)。MCSは 好ましくは放出増強核酸の直後(使用する場合には)、かつ、右側のTN10挿入配列の 10 直前に位置する。

[0204]

もう1つの実施形態では、宿主染色体へのエフェクター分子のランダムな組込みに起因す る遺伝子破壊により、エフェクター領人の遺伝子位置の適性を確認する。

[0205]

さらにもう1つの実施形態では、発現運搬体は抗生物質選抜を必要としない安定な、すな わち、自己維持される染色体外プラスミドである。限定するものではないひとつの実施例 では、自己維持型発現運搬体はサルモネラ病原性プラスミドである。

[0206] 例えば、本発明のある実施影態では、プラスミド遺抜系をサルモネラ菌などの細菌が失っ 20 ている機能を提供することで維持し、それに基づいて機能を有するサルモネラ菌をそうで ないものから選抜することができる。ある実施影熊では、本発明のサルモネラ蘭は栄養要 求性変異菌株であり、発現プラスミドは変異株すなわち生合成酵素機能が欠けたものを提 供する。発現プラスミドを含むサルモネラ繭は細胞を所襲の細胞、すなわち、発現プラス ミドを含むもののみが代謝できる栄養素を欠く増殖培師で増殖させることで裏抜できる。 この実施形態の非常に好ましい態様では、最も好ましくはasd遺伝子の欠失によって、 本発明のサルモネラ菌はDAP (メソージアミノピメリン酸) を不可避に要求する。DA Pはグラム陰性菌の周辺細胞質に存在するペプチドクリカンの構成要素であり、完全な細 菌外膜に必要である。DAPがないと細菌細胞は外膜が完全でないために溶解してしまう 。asd(βーアスパラギン酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ)遺伝子はDAP生合成 30 経路中の酸素をコードしている。asd機能を欠くグラム除性菌は培養培地にDAPを供 給することで増殖させられる。同種または異種プロモーターに機能しうる形で連結したa sd遺伝子配列を保持するプラスミド、例えば、本発明の発現プラスミドはDAPの不在

下でasd活性を欠くグラム除性菌を増殖させることで要抜できる(例えば、Cnrti ss. IIIの米国特計第5,840,483号参照)。 102071 その他の非抗生物質選抜系が当技術分野で知られており、かつ、本祭明の範囲内にある。

例えば、安定な毒素とあまり安定でない銃毒素を含んでなるプラスミドを利用する選抜系 を使用してかかるプラスミドを維持する細菌を選抜してもよい。

[0208]

もう1つの実施形態では、発現運搬体は非抗生物質的方法で選抜できる染色体外プラスミ ド、例えば、コリシンプラスミドである。本明細書において、コリシンプラスミドは最低 限コリシン毒素および抗コリシンをコードし(コリシン毒素は抗コリシンよりもより安定 である)、その結果、コリシンプラスミドを欠く細菌はいずれもコリシン毒素が継続する 結果として死滅する。好ましい寒旅影業では、ヨリシン毒素はCoIE3の大サブユニッ トであり、抗コリシンはColE3の小サブユニットである。

[0209]

本瑩明のその他の実施影態では、瑩現運搬体はよべクター、より詳しくは溶原性よべクタ である。好ましい実施形態では、λベクターを含んでなる細菌宿主は30℃では機能的 であるが37℃ではそうでない温度感受性λリブレッサーをさらに含んでなる。従って、50 細菌宿主は30℃で細菌細胞にとって毒性であり得る一次および/または二次エフェクター分子を発現せずにin vivoで増殖させ操作できる。細菌菌株の患者への導入の際には、λリブレッサーは正常な体温により不活化され、一次エフェクター分子および所望により二次エフェクター分子の発現が活性化される。

[0210]

エフェクター分子または融合タンパク質をコードする核酸配列の発現は、エフェクター分 子が組換えDNA分子で形質転換された細菌において祭項されるよう第2の核酸配列によ って調節できる。例えば、エフェクター分子の発現は当技術分野で公知のいずれかのプロ モーター/エンハンサーエレメントによって制御できる。プロモーター/エンハンサーは 同種(すなわち、天然のもの)または異種(すなわち、天然のものでない)であってもよ 10 い。細菌におけるエフェクター分子、例えば、サイトカイン、または融合タンパク質の発 現を制御するために使用できるプロモーターとしては、限定されるものではないが、8-ラクタマーゼプロモーター (Villa-Kamaroffら, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75:3727-3731), \$\tau k Iacプロモーター (DeBoerb, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:21-25: Scientific American. 1980. 242:74-94) などの原核生物プロモーターが挙げられる。本発明に 包含されるその他のプロモーターとしては、限定されるものではないが、1acl、1a cZ, T3, T7, gpt, \(\lambda P_R \, \lambda P_t \, trc \, pagC, sulA, polII (dinA), ruv, recA, uvrA, uvrB, uvrD, umuDC, lex 20 A、cea、caa、およびrecNが挙げられる (例えば、Schnarrら、 19 91. Biochimie 73:423-431参照)。好ましい実施形態では、プロ モーターはtrcである (例えば、Amannら、1988、 Gene 69:301 -15参照)。

[0 2 1 1]

一次エフェクター分子がSOS応答性プロモーターの制御下で発現されるコリシンである 特定の実施形態では、影響化調菌菌体をコリシンの発現が増加するようx級、素外級、ア ルカリ化剤または別のDNA損傷が心理してもよい。例示的SOS応答性プロモーター としては、限定されるものではないが、recA、sulA、umuC、dinA、ru v、uvrA、uvrB、uvrD、lexA、cea、caa、rccNなどが挙げら がれる。

[0 2 1 2]

もう1つの好ましい実施影繁では、プロモーターは腫瘍環境において増大した活性を有する、例えば、pepT遺伝子のP1プロモーターなどの腫瘍の癖気環境により治性化されるプロモーターである。P1プロモーターの活性化はFNR転写アクチペーターに依存している(Strauchら、1985、 月、Bacterioi、156:743ー751)。 特定の実施形態では、P1プロモーターは離気条件下でpepT20プロモーターなどの天然のP1プロモーターよりも高レベルで誘導される変異体プロモッターであり、糠気条件に応じてその活性がFNRではなくCRP-cAMPによって誘導さいた。179:1999-1 40 年17)。もう1つの実施形態では、蟒気約に誘導されるプロモーターの利えば、pot ABCDプロモーターを用いる。pot ABCDプロモーターを用いる。pot ABCDプロモーターターアから分岐して発現されるオペロンである。pepT遺伝子においてこの発現にあずかっているプロモーターは単離されており(Lombardo5、1997、1)。Bacterioi、179:1909-1917)、本発明の方法に従って使用できる。

[0 2 1 3]

あるいは、プロモーターはTallトランスポソンのtetプロモーターなどの抗生物質 誘導性プロモーターであってもよい。好ましい実施形態では、tetプロモーターは例前 は三倍に多量化されている。次いで、プロモーター活性は本発明の弱毒化腫瘍瘍的細菌で 治療された患者に適当な用量のテトラサイクリンを投与することによって誘導される。t m

10

20

e t 誘導可能な発現系は最初にスチゾサッカロミセス・ポンペ (Sehizosaceh aromyces pombe) (Farvar and Gatz, 1992, Cur rent Genetics 21:345-349) および哺乳類細胞 (Lang an d Feingold, 1996, Gene 168:169-171) などの真核細胞 系について記載されたが、最近の研究はその適用を細菌細胞にまで拡げている。例えば、 Stieger5 (1999, Gene 226; 243-252) ttetプロモータ ーに機能しうる形で連結される場合のtet誘導でホタルルシフェラーゼ遺伝子の80倍 の誘導を示した。このプロモーターの利点は極めて低いレベルのテトラサイクリン、すな わち抗生物質活性に必要とされる用量の約1/10で誘導されるということである。 [0214]

ひとたび、エフェクター分子または融合タンパク質を含んでなるプラスミドを構築し、弱 毒化腫瘍標的細菌に導入すれば、エフェクター分子祭刊または融合タンパク質祭頭は、関 定するものではないが、生物学的活性、酵素活性、ノーザンブロット解析、およびウェス タンプロット解析をはじめとする当技衛分野で公知のいずれかの方法によってアッセイで ಕೆಕ (Sambrooks, 1989, Molecular Biology: A L aboratory Manual, Cold Spring Harbor Press , Cold Spring Harbor, NY; Ausubelb, 1995, C urrent Protocols in Molecular Biology, Gre ene Publishing, New York, NY参照)。 [0215]

7. 組合せ療法

ある実施形態では、周形癌腫瘍を治療するために弱悪化腫瘍標的細菌をその他の公知の癌 療法とともに用いる。あるその他の実施形態では、固形癌腫瘍を治療するために1以上の エフェクター分子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現す るよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌をその他の公知の癌療法とともに用いる。例えば、 1以上のエフェクター分子および/または融合タンバク質をコードする1以上の核酸分子 を発現するよう設計された弱毒化腫瘍標的細菌を化学療法薬とともに使用してもよい。化 学療法薬の例としては、限定されるものではないが、シスプラチン、イホスファミド、タ キソールおよびパクリタキソールなどのタキサン、トポイソメラーゼ「興奮網(例えば、 CPT-II、トポテカン、9-AC、およびGG-211)、ゲムシクピン、ビノレル 30 ピン、オキサリプレチン、5-フルオロウラシル (5-FU)、ロイコポリン、ピノレル ピン、テモダール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エメチン、マイトマイシン、エ トポシド、テノボシド、ピンクリスチン、ピンプラスチン、コルチシン、ドキソルビシン 、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトザントロン、ミトラマイシン 、アクチノマイシンD、1ーデヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン 、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびプロマイシン相同物、およびサ イトキサンが挙げられる。あるいは、1以上のエフェクター分子および/または融合タン パク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された弱素化腫瘍標的細菌を放 射線療法(例えば、γ線またはx線形射)とともに使用してもよい、治療される標の種類 によっていずれの放射線療法プロトコールを用いてもよい。例えば、限定されるものでは 40 ないが、x 線を照射してもよく、特に、深い腫瘍には高エネルギーメガポルト (1 M e V エネルギー以上の照射)を用いてもよく、皮膚癌には電子ピームおよび正中電圧 x 線照射 を用いてもよい。放射線に組織を曝露するためにラジウム、コバルトおよびその他の元素 の放射活性アイソトープなどのヶ線放射性ラジオアイソトープを投与してもよい。 [0 2 1 6]

本発明は抗癌剤と弱毒化腫瘍標的細菌の逐次または同時投与を含む。本発明は、相加的ま たは相乗的である、抗癌剤と弱毒化腫瘍瘍的細菌の組み合わせを包含する。 [0 2 1 7]

本発明はまた、異なる作用部位を有する、1以上の抗癌剤と弱素化腫瘍癌的細菌の組み合 わせも包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗的であろうと相加的であろうと 50 、これらの治療の二重作用に基づいて改善された治療法を提供する。従って、本発明の新 規組合せ療法は単一興剤療法として用いられるいずれかの薬剤よりも向上した効力をもた らす。

[0218]

本発明はまた抗癌剤と1以上のエフェクター分子および/または融合タンパク質をコード する1以上の核酸分子を発現するよう設計された助舎化腫瘍標的調菌との逐次または同時 投与を含む。本発明は、相加的であるか相系的である、抗癌剤と1以上のエフェクター分 子および/または融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計され た現職や化闘等傾約額直と個熱合わせを包含する。

[0219]

本発明はまた、異なる作用部位を有する、1以上の統憲線と、1以上のエフェクター分子 および/または融合ランパク質をコードする1以上の核酸分子を発現するよう設計された 報器化鹽線的細菌との組み合わせを包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相乗 的であるうと相加的であるうと、これらの治療の二重の作用に基づいて改善された治療法 を提供する。従って、本発明の新規組合せ療法は単一準判療法として用いられるいずれか の業別よりも向上した効力をもたらす。

[0220]

5.8 送達のための方法および組成物

本発明は、復主に対する端性を低下させた眼跡化腫瘍標的細菌によって、宿主の全身に送 選されれば有郷であり得る1以上の一次エフェクター分子を服跡に同所的に送達できる方 没を提供する。ある実施影態では、一次エフェクター分子は内臓、リンパ艦、癌腫、また はその他の固彩臓跡癌を治療するのに有用である。ある限定するものではない実施影響で は、エフェクター 分子は臓療の部位での局所免疫応答の誘導に有用である。

[0 2 2 1]

本発明によれば、1以上の一次エフェクター分子をコードする核酸分子を含む弱毒化腫瘍 標的細菌ベクターおよび所望により1以上の一次エフェクター分子を、固形腫瘍癌を有す るか、患たは腫瘍細胞の夢後を防ぐ方法に用いるのが有利である。

[0222]

192621 本発明はかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で 9 連結された1以上の一次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱 等化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍高治療 疾のための1以上の一次エフェクター分子の送達法を提供する。本発明はまたかかる治療 を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の を必要とする動物に、1以上のご当なフロモーターに機能しうる形で連結された1以上の 大型でなる研発化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる 、固形腫瘍の治療のための1以上の一次エフェクター分子の送達法を提供する。ある実 能影館では、一次エフェクター分子はTNFファミリーのメンバー、細胞機害性ペナンド またはよりパブチド、抗血管新生因子、腫瘍阻害酵素、またはその嫌能的断片である。

[0223]

本発明はかかる治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに機能しうる影で 離結された本発明の1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を含んでなる 弱毒化腫瘍操的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでなる、固形腫瘍癌の 治療のための本発明の1以上の融合タンパク質の送達法を提供する。本発明はまたかかる 治療を必要とする動物に、1以上の適当なプロモーターに提能しうる影で連結された本発 明の1以上の数合分ンパク質おまが1以上のステムター分子をコードする1以上の核酸 分子を含化でなる弱率化腫瘍裸的細菌を含んでなる医薬組成物を投与することを含んでな る、固形態癌の法ののための本発明の1以上の融合タンパク質および1以上のエフェク ター分子の送療法を提供する。

[0 2 2 4]

50

好ましい実施彩態では、現毒化煙器標的欄面はサルモネラ面である。もう1つの実施形態では、弱毒化腫瘍標的細菌は増強された放出系を含んでなる。好ましい実施彩源では、動物は哺乳鏡である。高度に好ましい実施彩號では、動物はヒトである。

[0225]

本条明はまたサルモネラ菌などの頭毒化腫塩標的細菌によって光速される、1以上の一次 エフェクター分子と所望により1以上の二次エフェクター分子の組み合わせ送速を提供す る。本発明はまた1以上の異なる一次エフェクター分子および/または所望により1以上 の異なる二次エフェクター分子を保持する、異なる弱者化腫瘍繰的細菌の組み合わせ送速 も進伐する。

102261

本発明はまたサルモネラ菌などの別毒化腫脈操的細菌により送達される、本発明の1以上 の融合ランパク質の送達を提供する。本発明はまた、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍操わ 細菌によって送控される、本発明の1以上の融合タンパク質と所望により本発明の1以上 のエフェクター分子の組み合わせ送達を提供する。本発明はまた1以上の異なる融合タン パク質および/または所望により1以上の異なるエフェクター分子を保持する、異なる弱 等化腫瘍腫的細菌の組み合わせ送達を提供する。

[0227]

■彩羅夢としては、限定されるものではないが、肉腫、整腫および限定されるものではないが生殖細胞采腫第、中枢神軽系の腫瘍、乳癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮癌、肺癌、卵巣癌、精巣癌、甲状腺癌、星状類胞腫、神経膨脹、脾臓癌、胃癌、肝臓癌、原腫癌、異色 24 無風、腎腫癌、尿液・ 25 によび中皮腫をはじめとするその他の固形腫瘍癌が挙げられる。 点 者は好ましくは、限定されるものではないが、ウシ、ブタ、コラトリ、イス、ネコ、ウなどのような動物をはじめとする動物であり、近まりは鬼類であり、最も好ましくは 性乳質であり、最も好ましくは と下である。 本明練書において、回影態療の治療とは、限定されるものではないが、腫瘍 増殖を阻害すること、 題等 細胞増殖を阻害すること 、 25 には 腫瘍細胞の身体のその他の部分への要延 (低移)を阻害することを含む。

[0228]

本発別は医薬上許容される担係および1以上の適当なプロモーターに構能しうる形で過結された1以上の一次エフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる弱感の 個高傾的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。本発別は医離上許容される担体ならが に1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された1以上の一次エフェクター分子および1以上の二次エフェクター分子をコードする1以上の検険分子を含んでなる弱等 化機場線的線菌を含んでなる医薬組成物を提供する。

[0229]

本発明は医薬上許容される担体および1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結 された本発明の1以上の融合タンパク質をコードする1以上の核酸分子を含んでなる眼毒 化腫瘍標の細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。本発明は医薬上許容される担体なら びに1以上の適当なプロモーターに機能しうる形で連結された本発明の1以上の融合タン パク質および1以上のエフェクター分子をコードする1以上の核酸分子を含んでなる眼毒 化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物を提供する。

[0230]

本発明はまた医薬上許容される担体および弱毒化腫瘍標的細菌を含んでなる医薬組成物も 提供する。本発明はまた医薬上許容される担体ならびに1以上の一次エフェクター分子を よび所望により1以上の一次エフェクター分子を含んでなる弱帯化腫瘍標的細菌で含んで なる医薬組成物も提供する。かかる組成物は治療上有効な量の、1以上の一次エフェクター 一分子および所望により1以上の二次エフェクター分分を含んでなる弱帯化腫膨寒計解 モネラ菌ベラーならびに医薬上許容される担体を合んでなる。本規則はまた原上許容 される担体ならびに本発明の1以上の融合タンパク質および所望により1以上のエフェク ター分子が成功があまれる担体を含めてなると変数がも提供より ラー分子を含んでなる。現物な量の、本発明の1以上の融合タンパク質は、といる がかる組成物は治療上有対な量の、本発明の1以上の融合タンパク質がよび所覚により1500のでは、1500 以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌ベクターならびに医薬上許容される担体を含んでなる。

[0 2 3 1]

特定の実施形態では、「医薬(製薬)上許容される」とは、連乳または州政府の監督官庁 によって承認された、または米国薬品方もしくは動物、より難しくはヒトに使用するため のその他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。「担体」とはそれ とともに治療薬が投与される希釈剤、佐剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。かかる医薬 担体は水および、ピーナッツ油、ダイズ油、無機油、ゴマ油、オリーブ油などのような石 油、動物、植物からのまたは合成起源のものをはじめとする油などの減菌液体であってよ い。医薬組成物が静脈投与される場合には生理食塩水が好ましい相体である。また、生理 10 食塩水溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液は特に注射用溶液のための 液体担体として使用できる。好適な医薬賦形剤としてはデンプン、グルコース、ラクトー ス、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、胡粉、シリカゲル、ステアリン酸ナトリ ウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グ リセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどが挙げられる。組成物は所堅に より少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤を含んでもよい。これらの組成物は溶 液、懸濁液、エマルション、磐削、丸制、カブセル制、散制、徐法性製剤などの影態をと り得る。経口製剤は医薬等級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグ ネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどのような標準的な 担体を含み得る。好適な医薬担体の例はE、W. Martinによる「Remingto 20 n's Pharmaceutical Sciences! に記載されている。かかる組 成物は治療上有効な量の、精製された形態の治療用の弱悪化腫瘍標的細菌を、患者への適 当な役与のための影態を提供する好適な量の相体とともに含む。製剤は役与護式に適合す るべきである。

[0232]

好ましい実施影響では、組成物は慣例の手順に従ってヒト生命体への静儼投与に合わせた 医薬組成物として処方される。典型的には、静脈投与用組成物は減菌等選水性パッファー の治液である。必要であれば、組成物はまた沈脈的上刺および性射能位で痛みを和らげ るにはリケノカインなどの風所麻酔剤を含んでもよい。一般に、成分は個別にまたは混合 して単位用量影態で、例えば、有効薬剤の量を示すアンブルまたはサッシェなどの密閉容。 器中の減能物能剤また状态を含まない熱熱物をして保給される。組成物を点流によって 校与する場合には、減菌医薬等級水または生理食塩水を含む点滴ボトルで調剤してもよい 。組成物を注射によって役与する場合には、成分を投与前に混合できるよう注射用減菌水 または牛理合塩水のアンプルが場性さればある。

102331

「歯形腫瘍性の治療または予防に有効である本発別の医薬組成物量は癌の性質によって異なり、標準的な臨床技術によって決定できる。さらに、所望により最適な用車範囲を確認するのを補助するために、in vitroでナッセイを使用してもよい。成方に使用される正確な用量は投与経路、および癌の量態度によっても異なり、関乗医の判断および各患者の以及に続って決定されるべきである。しかしながら、一般には、好適な用量範囲は約1、0 c.f.u./kg×所望により約1×10°c.f.u./kg×所望により約1×10°c.f.u./kg×のし約1×10°c.f.u./kg×のし約1×10°c.f.u./kg×のし約1×10°c.f.u./kg×のし1×10°c.f.u./kg×のし1×10°c.f.u./kg×のし1×10°c.f.u./kg×のし1×10°c.f.u./kg×のし1×10°c.f.u./kg×のし1×10°c.f.u./kg×のし1×10°c.f.u./kg×のし1×10°c.f.u./kg×のし1×10°c.f.u./kg×の力用量はin vitroで得られる用量な容曲類または動物モデル試験系かる推定できる。

10234

種々の送達系が知られており、本発明の医薬組成物を投与するために使用できる。等入方法としては、限定されるものではないが、皮の内、筋内、腹腔内、膨脹内、皮下、くも機下 腔内、鼻腔内、硬膜外、および軽口経筋が挙げられる。等入方法はまた腫瘍内(例えば、5% 腫瘍領域への直接投与による) であってもよい。

[0235]

[0236]

特定の実施彩態では、本発明の医薬組成物を治療を必要とする領域に局所的に投与することが整ましい場合もあり、これは例えば、限定されるものではないが、手馬の際の局所注入、カナーチルによる注入、またはシアラスティック(8 i a 1 a 3 e 1 i c) 限度 どの帳もしくは機能をはじめとする多孔性、非多孔性、あしくはゼラチン状物質であるインプラントによって達成できる。ある突施形態では、影性関係または新生物もしくは新生物発産市銀組織の部位(または元の部位)に直接注射によって投与し得る。

[0237]

1以上の一次エフェクター分子および新望により1以上の二次エフェクター分子を含んで なる弱毒化腫瘍標的細菌は徐放システムで送達できる。本発明の1以上の融合タンパク質 20 および所望により1以上のエフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌も徐放シス テムで送達できる。ある実施形態では、ポンプを使用する場合もある(Langer、上 記; Sefton, CRC Crit, Ref. Biomed. Eng. 14:20 1 (1987); Buchwaldら、1980, Surgery 88:597;お よびSaudek 6, 1989, N. Engl. J. Med. 321;574巻 照)。もう1つの実施形態では、高分子材料を使用する場合もある (Medical A pplications of Controlled Release. Langer and Wise (編), CRC Press., Boca Raton, Florid a (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smole 30 n and Ball (編), Wiley, New York (1984); Rang er and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macro mol. Chem. 23:61 (1983)参照; Levy5, 1985, Scie nce 228:190: During5, 1989, Ann. Neurol. 25 :351:BLOHoward5, 1989, J. Neurosurg, 71:10 5 も参照)。さらにもう1つの実施形態では、徐赦システムを治療標的、すなわち、全身 用量の一部のみを必要とする脳の近くに置くこともできる(例えば、Gpodspn。 in Medical Applications of Controlled Rele ase, 上記, 2巻, 115-138頁(1984)参照)。

[0238]

その他の徐敖システムはLanger (1990, Science 249:1527 - 1533)による鞍殻で論じられており、1以上の一次エフェクター分子および所望に より1以上の二次エフェクター分子を含んでなる弱毒化腫瘍標的細菌の投与と関連して使 用できる。

[0239]

本発明はまた本発明の医薬組成物の1以上の成分を充填した1以上の容器を含んでなる医 薬パックまたはキットを提供する。かかる容器に関しては、隠意的に、医薬品または生物 学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって指示される形の通知がある 場合もあり、この通知はヒト投与のための製造、使用または販売に関する機関による決定 を反映している。 [0 2 4 0]

本発明はまた本発明の医原組成物および少なくとも1種のその他の医知の癌治療をそれを必要とする動物に投与することを含んでなる固形腫瘍の治療法を提供する。特定の実施を観聴する。他学療法薬の例としては、限定されるものではないが、シスプラチン、イホステミド、タキンールおよびパタリタキットルなどのタキサン、トポインメラーゼ1担害剤(例えば、CPTーII、ドボテカン、9 - ACおよびGG-211)、ゲムシタビン、ビノレルビン、オキサリブテナン、5 - フルオロウラシル(5 - FU)、ロインマイトマンとピノレルビン、オキサリブラナン、5 - フルオロウラシル(5 - FU)、ロインマイトマイジン、ストポシド、テノボンド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルチンン、ドキリシン、エトポンド、デノボンド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルチンン、ドキリマイシン、アクチノマイシンD、1 - デヒアストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リカイン、プロブラノロール、およびプロマイシン和同物、およびサイトキサンが挙げられる。

[0 2 4 1]

[0242]

本発明はまた、異なる作用部位を有する、抗癌期と1以上のエフェクター分子および/または厳合クンパク賞をコードする1以上の核酸分子を発現するよう認計された明晰化腫瘍 植物細菌の組織や合わせも包含する。かかる組み合わせは、組み合わせが相無的であるうと 相加的であるうと、これらの治療の二重の作用に基づいて改善された治療法を提供する。 後のて、本発明の前類組合せ療法は単一薬剤療法として用いられる薬剤のいずれかよりも のとした効力をもたらす。

[0 2 4 3]

ある実権影態では、固彩騰瘍態の動物に本発明の医薬組成物を投与し、かつ、放射線療法 (例えば、y線またはx線照射) で治療する。特定の実施形態では、本発明は放射線療法 では効果がないと示されている癌の治療法またほ子助法を提供する。医薬組成物は放射線 療法と同時に投与してもよい。あるいは、放射線療法を本発明の医薬組成物の投与後に、 好えくは医薬組成物の投与の少なくとも1時間、5時間、12時間、1日、1週間、1 ヶ月、より好ましくは数ケ月(例えば、3ヶ月まで)後に役与してもよい。

[0244]

本発明の医薬組成物の投与の前、同時、またはその後に投与される放射線療法は当技術分 4 野で公知のいずれかの方法で投与できる。治療される塩の種類大第でいずれの放射線療法 プロトコールを使用してもよい。例えば、膜定されるものではないが、x線照射を投与し てもよく、特に、深い腫瘍には高エネルギーメガボルト(1 Me V エネルギーより高い照 射)を用いてもよく、皮膚癌には高子ビームおよび正中電圧 x線照射を用いてもよい。放 射線に組織を碾塞するためにラジウム、コバトおよびその他の元素の放射活性アイント ープなどのy線放射性ラジオアイソトーブを投与してもよい。

[0 2 4 5]

さらに、本祭明はまた放射線療法があまりにも奪性を示すか、または示し得る、すなわち、 、治療を受けている患者にとって受け入れられないか、または耐えがたい副作用をもたら す場合に、放射線療法の代替として傷を医薬組成物で治療する方法を提供する。 (62)

[0246]

5.9 本発明の医薬組成物の治療または予防有用性の証明

本発明の医薬組成物はヒトにおける使用に先立って所望の治療または予防活性について好 ましくはin vitroで、次いでin vivoで試験される。例えば、特定の医薬組 成物の投与が指示されるかどうか決定するために使用できる in vitroアッセイと しては、患者組織サンブルを培養で増殖させ、医薬組成物に曝露するか、あるいはこれを 投与し、かかる組成物の組織サンブルに対する作用を観察する、in vitro細胞塔 巻アッセイが挙げられる。

[0 2 4 7]

本発明の医薬組成物は免疫細胞を試験医薬組成物または対限と接触させ、試験医薬組成物 10 の免疫細胞の生物学的活性を調節する(例えば、増大させる)能力を調べることによって 、活性化された免疫細胞を増強するその能力について試験できる。試験組成物の免疫細胞 の生物学的活性を調節する能力はサイトカインまたは統原の発現を検出すること、免疫細 胞の増殖を検出すること、シグナル伝達分子の活性化を検出すること、免疫細胞のエフェ クター機能を検出すること、または免疫細胞の分化を検出することで評価できる。これら の活性の測定には当業者に公知の技術を使用できる。例えば、細胞増殖は®Hーチミジン 取込みアッセイおよびトリパンプルー細胞計数によってアッセイできる。サイトカインお よび抗原発現は、例えば、限定されるものではないが、ウェスタンプロット、免疫組織化 学放射免疫アッセイ、ELISA(酵素免疫吸着アッセイ)、「サンドウィッチ! 免疫ア ッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル内沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセ 20 イ、補体結合アッセイ、免疫放射線アッセイ、蛍光免疫アッセイ、タンパク質A気疫アッ セイおよびFACS解析などの技術を用いる競合アッセイおよび非続合アッセイ系をはじ めとする免疫アッセイによってアッセイできる。シグナル伝達分子の活性化は、例えば、 キナーゼアッセイおよび電気移動度シフトアッセイ (EMSA) によってアッセイできる 。T細胞のエフェクター機能は、例えば、51Cr放出アッセイによって測定できる (例 えば、Pailadinoち、1987、Cancer Res、47:5074-5 079およびBlachereら、1993、J. Immunotherapy 14 :352-356参照)。

[0248]

本発明の医薬組成物は癌を患う動物において腫瘍形成を低下させるその能力について試験 30 できる。本発明の医薬組成物はまた固形腫瘍癌に関係する1以上の症状を軽減するその能 力について試験できる。さらに、本発明の医薬組成物は固形腫瘍癌を患う患者の生存期間 を延長するその能力について試験できる。当業者に公知の技術を用いて動物における本発 明の医薬組成物の機能を分析できる。

[0249]

種々の特定実施影態では、顕影腫瘍癌に関与する細胞種のうち代表的な細胞を用いてin vitraアッセイを実施し、本発明の医薬組成物がかかる細胞種に対して所望の作用 を及ぼすかどうかを調べることができる。

[0.25.0]

治療用の本発明の医薬組成物はヒトにおける試験に先立って、限定されるものではないが 40 、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブク、イヌ、ウサギなどをはじめとする好適 な動物モデル系で試験できる。ヒトへの投与に先立つin vivo試験のために、当技 術分野で公知のいずれの動物モデル系を用いてもよい。

[0 2 5 1]

以下の一連の実施例は例示のために示されるのであって、本発明の範囲を限定するもので はない。

[0 2 5 2]

実施例:弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌によるTNF-aの発現

以下の実施例は、TNFファミリーのメンバーをコードする核酸分子を含有する弱毒化腫 ※標的サルモネラ菌などの細菌がTNFファミリーのメンバーを発現できることを証明す 50 40 [0253]

6. 1 TNF-aブラスミドの構築

本明細書に記載されるプラスミドは本発明の特定の実施影鑑の実施例を示すためのものである。当業者には明らかであろうが、trcプロモーターおよび/またはTNF−。をコードする核酸などのプロモーターおよび/またはエフェクター分子をコードする核酸は当技術分野で公知の方法によってその他の適当なプロモーターまたはエフェクター分子で置接してもよい。

10 2 5 4 1

も r c プロモーターを用いる、エフェクター分子をコードする核酸のプラスミドに基づく 10 細菌による発現のために、プラスミドTr c 9 9 A (P h a r m a c i a から市販されて いる)またはTr c H i s B (I n V i t r o g e n から市販されている)を用いた。 両プラスミドとも関始コドンとしてのN c o i 部位とそれに続くマルチブルクローニング 話位を用いる。

[0255]

6.1.1. pCETプラスミド

[0256]

6. 1. 2. pTSプラスミド

[0 2 5 7]

6. 1. 3. pTS-TNF-aプラスミド

trcプロモーターによって副御されるヒト $TNF-\alpha$ をコードする核酸のpTS媒介性 染色体組込みのために、プラスミド $(pTS-TNF-\alpha)$ を以下のように籍築した。プ 50

ラスミドPYA3332は、複製関始点がcolE1プラスミド(例えば、Bazara 1およびHelsinki, 1970, Biochem 9:399-406参照)の 複製開始点で置換されているASDプラスミドPYA272である(例えば、Carti ss, IIIの米国特許第5, 840, 483号参照)。プラスミドPYA3332を制 限酵素Ncolで切断し、mung beanヌクレアーゼで平滑末端とした。次いで、 平滑末端とした断片を制限酵素Hindlllで切断して3.3kbのDNA断片を単離 した。次いで、図1に示される大鵬菌最適化ヒトTNF-αをコードする核酸 (Penn icab, 1984 Nature 312:724-729:33USalztman 6, 1996, Cancer Biotherapy 11:145-153参照) を翻 限酵素NdeIで切断し、T4DNAボリメラーゼで平滑末端とし、次いで、制限酵素H 10 ind IIIで切断した。得られたり、5kbの断片を3、3kbのPYA3332断片 に結合してプラスミドAsd34TNF-aを得た。次いで、Asd34TNF-aを制 限酵素Bg IIIで切断し、trcプロモーターによって制御されるTNF-aをコード する核酸をコードする1、1kbの断片をpTSのBamHI部位に結合してプラスミド pTS-TNF-αを得た。 [0 2 5 8]

6. 1, 4, pTS-BRPプラスミド

BRPをコードする核酸のトランスポゾン條介性染色体組込みおよびエフェクター分子をコードする核酸のトランスポゾン條介性染色体組込みおよびエフェクター分子をコードする核酸のトランスポゾン條介性染色体組込みおよびエフェクターラミドを以下のように構造した。配列CCGACGCGTGAAAACTGGAG(配列番号5)からなる正プライマーおよび配列CGACGCGTGAAAGGATCTCAAGAAGATC(配列番号6)からなる正プライマーを用いるPCRによってBRPをコードする核酸をプラスミドpSWI(BiolOl, Vista, CAから市販されている)から単雄してTOPOTAクローニングプラスミド(InVitrogen, Carlsbad, CAから市販されている)にクローエグしてpBRP#5と示されるプラスミドを得た。プラスミドpBRP#5を制限墜業ApaIおよびBamHIで切断し、得られたBRPをコードする核酸を含むの、6kbのパンドで5.9kbのApaIがBamHIで切断し、得られたBRPをコードする核酸を含むの、6kbのパンドで5.9kbのApaIがBamHIで切断し、得られたBRPをコードする核酸の網入のためのクローニング部位はBRPを理ードする核酸の5、および3、の両側に存在した。

6. 1. 5. pTS-BRPTNF-aプラスミド

BRPおよびtreプロモーターによって制御されるTNFーαをコードする核酸のpT S媒介性染色体組込みのために、プラスミド(pTS-BRPTNFーα)を以下のよう 能構築した。pTS-TNF-αの構築のために上記に記載したプラスミドAsd34T NF-αを制限酵素Bg1IIで切断し、treプロモーターによって制御されるTNF αをコードする核酸をコードする1.1kbの断片をpTS-BRPのBamHI部位 に結合してプラスミドpTS-BRPTNF-αを得た。 【0260]

6.2. エフェクター分子をコードする核酸のサルモネラ面積主染色体への組込み 本 卵細管に配載される系は、セリンまたはグリシン栄養要求性のΔserCーサルモネラ菌 株および活発に転写される領域への染色体組込みの際にセリン/グリシン原栄競性を回復 するブラスミドを用いる。しかしながら、染色体組込み体を選抜するためにその他の選択マーカーを使用してもよいということは当技術分野では十分に知られており、かかるマーカーは本発明の範囲内にある。例えば、Klecklerら、1991、Meth. Enzymol. 204:139-180参照。

-[0 2 6 1]

エフェクター分子をコードする核酸を含むpTSまたはpTSーBRPプラスミドを化学 的影質転換およびエレクトロポレーションをはじめとする当技術分野で十分に公知のいく つかの手段によってserCーサルモネラ酸株に導入してもよい。エフェクター分子をコ 功

10

ードする核酸の導入後、サルモネラ菌をアンピシリン含有増殖結準で最小機 2時間、より 好ましくは6時間以上増殖させる。次いで、七リン原栄養性の欄菌を選抜できる培地、例 えば、M56培地、Atlas, R. M. 「Handbook of Microbio! ogica! MediaJ L. C. Parks, 編, CRC Press. Boca Raton, Florida, 1993に細菌をおく。エフェクター分子をコードする 核酸の染色体組込みを有する細菌は選抜培地で増殖できる。 メいで、エフェクター分子を ファンターカーをである 核酸の発現な酸素活性、生物学的活性、ノーザンブロット解析、またはウェスタンブロット ト解析などの当業者に公知のいくつかの方法のいずれで測定してもよい。 「02621

6. 2. 1. サルモネラ南によって発現されたTNF-αの送達および発現

上記のように、trcプロモーターによって制御されるTNFーαをコードする核酸をpTS-BRPのBRのBRの出 I 都位に挿入してpTS-BRPTNFーαと示されるプラステを得た。当技術分野で全知の標準的な方法によって、プラスミアDTS-BRPTNFαを決定、当成部分が全型の標準的な方法によって、C(図2)となるようにちょってした。とて構築したネズミテス菌の研験化菌株 圏株VNP2009(図解学部VO99/13053参照)にエレクトロポレーションした。メカニズムについて腰定許するものではないが、プラスミドの細菌がリムへの組込みによりまらすCをコードする核酸の活性を値をアデニンを透加したM56業プレートにプレーティングすることでTNFαを220下ドする核酸の染色体組込みを有する細菌を選択した。細菌を、プラスミドの悪性が、DFCの染色体組込みを有する細菌を選択した。細菌を、プラスミドの要失および同時にプラスミドに基づくTNFα発現の要失を示す、アンピシリン耐性の要失についてさらに特性決定した。

本発卵の繼續を構的とする細菌によるTNFー。の発現を調べて定量するために、TNFー。をコードする核酸の染色体組込みを有するサルモネラ菌を一晩増増させ、培養物の測定したサンブルをウェスタンプロット解析に用いた。特に、pTS一BRPTNFーaクローンと示される代表的なserC。アンピシリン感受性クローンからのTNFーaの発現が図3に示されている。ウェスタンプロット解析により、3.9×10°cfuのpTS-BRPTNF-aクローン2細菌は相当する(レーン1)細菌タンパク質が50n mgより多いTNFーaを発現するということが示され(レーン1)、このことは10ng / 10°細菌より多いレベルでのTNF-aの発現を示唆する。従って、ヒトTNFーaは、サルモネラ菌において、染色体に組み込まれた、trcプロモーターによって制御されるTNF-aをコードする核酸から上手く発現された。

7. OMPA融合タンパク質を発現する弱毒化腫瘍膜的細菌

種々のシグナルペプチドへの融合によるタンパク質の周辺細胞質局在化はシグナルペプチドとタンパク質の双方に依存している。例えば、タンパク質はタンパクでのアミノ末端へのシグナルペプチドの配合によって細菌の細胞周辺コパートメントに局在化され得る。 限定することはないが、周辺端胞質局在化は、細菌の成分(タンパク質など)が周囲の環境に放出されるために単一の膜のみを過過すればよいので、細菌の成分の飲出を促過すると考えられている。 対照的に、細胞質内属在化は、成分が周の環境に放出されるためには細菌の内臓と外臓の双方を通過することを要求する。 さらに、特定のタンパク質の周辺細胞質角在化は生物学的活性を補助する場合もある。

[0 2 6 5]

本発別のエフェクター 分子を周辺細胞复に向けるためには当技術分野で公知の種々の方法 を使用できる。本実施例はTNFーα、TRAIL (TNFーα 間違アポトーシス誘導性 リガンド)、およびインターロイキンー2 (ILー2) などのエフェクター分子のアミノ 末端へのοmpAシグナルペプチドの融合が周辺細胞質局在化とその後のタンパク質のプ ロセッシングをもたらすということを証明している。 [0266]

7.1. OMPA-TNF-α融合タンパク質のプロセッシング

4種の具な各クローンにおけるTNFー。登現、すなわちJM109細菌においてプラスミドに基づくして・でプロモーターによって動かされるompATTNF-a 融合ウンパケ 質の発現を金細胞治解物のウェスタンプロット解析によって調べた。周辺細胞質に易在する酸素であるシグナルペプチダーゼによる前駆体腺合タンパク質の成款TNFFaへの切り 断によって周辺細胞質局在が証明された。4種のクローンすべてにおいて、IPTGでの誘導機であるアトーaの過剰発現により、TNF-aが、プロセッシングされていない型とプロセッシングされた型の双方に対応する約20kdで移動する二重線として現れた(図 プロセッシングされた型の双方に対応する約20kdで移動する二重線として現れた(図 方、レーン4~7)。比較のために、映色依に組み込まれたTNF-aを可はする対照として用いて、金銭は依当なおかながた(図 5、レーン2)。

[0267]

これらの結果は、成熟ヒトTNF-aヶンパク質の大勝菌。mp Aシグナルベプチドへの融合(個4に示されるような)は大勝西で発現される場合には利型細胞負債をおよびプロセッシングもたらすということを延明する。さらに、分泌されるタンパク質の過剰発現が細胞指定にとって毒性であるかどうかは、正常な分泌組織が圧倒的に多いためにわからなかった。プロセッシングされたomp A TNF-a 融合クンパク質の発現についてのこの証明は正常な分泌組織は分泌されるタンパク質の高レベル発現に適応できるということ 20 を示唆した。

[0268]

7.2. OMPA-TRAIL融合タンパク質のプロセッシング

omp AシグナルペプチドのTNFファミリーのメンバーを周辺細胞質に局在させる能力 を、TNFファミリーのもう1つのメンバーであるTRAIL (TNF)ー 同胞速アボトー シス誘導性リガンド)にまで拡張した。これらの実験のために、ヒトTRAIL (トTR AIL) の成熟型をコードする、ヒェcプロモーターによって動かされるTRAILをコードする後密をomp Aシグナルペプチドのコード配列に凝合した(図6に示されるように)。一方はNcolで配位をコードし、もう一方はNdeI都位をコードする。2種の異なるomp A/TRAIL接合点を調べた(NdeIを含む配列については図6参照)。両の種のクローのウェスタの解析が図7に示されている。抗由TRAIL接を用いるウェスタンプロット解析によってNcoI接合したomp A一TRAILを過剰発明する細菌は由TRAILのプロセッシングされた型(28.2 kd) とプロセッシングをればいない型(30、2 kd) の数方を発現し図7、レーシ2~4)、他の12~4)、他の12~4)ということが示されているプロセッシングをもたらしたを示して、このことはNdeI接合がより効率的なプロセッシングをもたらしたということを示唆する。

[0 2 6 9]

これらの結果は、成熟とトTRAILタンパク質の大鵬菌のmp Aシグナルベブチドへの 融合は周辺調胞質局在およびプロセッシングをもたらすということを証明した。さらに、 分泌されるタンパク質の温剥発現が細菌宿主にとって毒性であるかどうかは正常な分泌組 織が圧倒的に多いためにわからなかった。プロセッシングされたomp A一TRAIL酸 合タンパク質の発現についてのこの証明は正常な分泌組織は分泌されるタンパク質の高レ ペル発現に適応できるということを示唆した。

[0270]

7. 3. OMPA (8L) - IL-2融合タンパク質のプロセッシング

 C125A) IL-2を図8に示されるように、ompA(8L)と示される改変omp Aシグナルペプチドに融合させた。改変ompAシグナルペプチドはompAシグナルペ アミノ酸6~17を図8に示されるもので置換することによって改変した。発現およびプロセッシングが図9に示されている(レーン6および7)。各レーンは単一のクローンを表す。ウェスタンプロット解析の結果はompA(8L)シグナルペプチドを用いることで、事実上完全なプロセッシングが認められるということを示した(図9、レーン6および7)。

[0271]

7. 4. PHOA (8L) - IL-2融合タンパク質のプロセッシング

ヒトIL-2の周辺細胞質局在およびプロセッシングについて第2の融合タンパク質を調 10 ペー、3、 第の融合タンパク質と開転した。図10中で、phoA(8L)と示される改変phoAグシグナルペプチドに融合した成熟とト(C125A)IL-2の発現およびプロセッシングを調べた。発現およびプロセッシングが図9に示されている。ompA(8L)シグナルペプチドを用いてより完全なプロセッシングが認められたのに対し(図9、レーン64まび7)、合成phoA(8L)シグナルペプチドでは部分的なプロセッシングしか認められなかった(図9、レーン4および5)。

[0272]

これらの結果はIL-2の局在およびプロセッシングが異なるシグナルペプチドによって 接供されたということを示す。この結果はまた、程々のシグナルペプチドへの融合による タンパク質の周辺福胞質局在はシグナルペプチドとタンパク質の双方に依存しているとい 20 うことを証明する。

[0273]

融合タンパク質研究の結果は、 I 1 − 2 などの本発明の二次エフェクタータンパク質はの 取りままたはP h o Aなどのタンパク量シゲナルペプチドとの融合によって発現され、 電 面の周辺細胞質に周在され得るということを示す。当業者には明らかであろうが、その他 のシグナル配列を用いて利用され得るエフェクター分子の周辺細胞質を引き起こすこ ともできる。当業者にはさらに明らかであろうが、未明のその他のエフェクター分子を 本明細書の実施例に記載されるエフェクター分子と置換することもできる。 [0 2 7 4]

8、 突旋例:成熟型のTNF-αを発現するサルモネラ (ΔMSBB、ΔPURI) の 抗腫瘍効果

以下の実験は、一次エフェクター分子(例えば、TNFファミリーのメンバー)をコード する収蔵を含むサルモネラなどの弱端化腫瘍裸的細菌は哺乳類腫瘍に一次エフェクターを 透達することができ、腫瘍体精を減少させることを証明する。

[0275]

TNF- αのネスミナフス菌(Salmonella typhimurium)の抗腫 転効発を高める能力は段階的かなネスト熱 385艦モデルで評価した。これらの実験では、大點38艦馬由来の1mm の艦螺筋片をC57BL/6マウス腫瘍へ移植し、腫瘍を平均ゆイズ約0、3gまで増殖させ、この時、動物を以下の処理部 (n=10)に無作為に配置した:1)無処理:2)ネズミナフス菌 (nm b B、Apurl、serC) (執株):および3)pTS-BRPTNF-α(上配の大腸2)。各群のマカスは処理したいか、あるいは適当な細菌体1×10°cfuの砂線と対象し日端した。細菌接種時とないか、あるいは適当な細菌体1×10°cfuの砂線と対象と日端した。細菌接種時

[0276]

から始め、毎週腫瘍サイズを測定した。

 $\mathbf{TNF} - \mathbf{z}$ を発現する根準化腫瘍操向サルモネラを賄した群では、処理後2週間で腫瘍の 退輸が明白であり、処理後4週間以内に動物のうち6個体で完全な退輸が見られた(図1 1)。無処理群では腫瘍は徐々に大きくなったが、ネズミチフス葡萄線(Δ msbB、 Δ purI、serC)で処理した群の腫瘍は処理後3ないし4週の間に部分的退縮を示したが、その後後々に大きくなった(図11)。

[0277]

16

(68)

これらの結果は、弱毒化腫瘍標的サルモネラがTNFファミリーのメンバーなどのエフェ クター分子を発現して腫瘍へ送達できることを証明するものである。このようなサルモネ すは腫瘍の治療に有用であり、TNFファミリーのメンバーを発現しないサルモネラ観株 と比較して腫瘍退縮の結果を増強する。

[0278]

楽色体に組み込まれた核酸から ΥΝΓーα を発現する サルモネラにより完全な腫瘍退縮が 示されることは、染色体に組み込まれたエフェクター 分子をコードするからから生物学的 に有効な発現が生じるということを示す。

[0279]

9. 寒燥例: BRPを発現する細菌による材酸分子の浅溢の増強

BRP活性がサルモネラなどの弱毒化腫瘍標の細菌からのプラスミドの飲出を増強するとを示すため、プラスミドならびに放出マーカー(AMPマーカーを有するpTrc99。)として用いられる等2のプラスミドにBRPを含んだ弱毒化腫瘍膜的サルモネラ株を構築した。BRPの活性を評価するため、BRPを含む、あるいは含まないサルモネラで表達薬をはたよる培養で増せる。次ぎに得られた上清から造心人が認めないサルモネって残存する細菌を除去した後、内管な上清をロンビテント細胞に加え、彩質転換反応を行った。次ぎにこれらのレシピエント細胞をしまる単一で平板培養し、AMPマーカーブラスミドの取り込みを翻るRRPを有するAMP耐性コロニー数が増加していれば、より多くのプラスミドがBRP発訊株から培地へ放出されたことを示す。

【0280】 結果は以下の表2に要約されている。

[0281]

表 2 1

プラスミド	Ann の平均数 コロニー/形質振棒
pTrc99a 単独	125
pTrc99a+BRP (pSW1)	383

[0282]

これらの結果はBRPが存在すると培地へ分泌される ampプラスミドの豊が増えたこと 多を示している。このように、BRP発現網胞由来上清の「レシピエント網胞」への形質転換ではコロニー数が増える。これらの結果は、BRPが核酸プラスミドを含む二外エフェクター分子の放出を増強したことを示す。従って、これらの結果は、BRPがプラスミドの放出をはDNA送過任有用であることを示す。ちらに、BRPがプラスミド適することができるこれらのサルモネラ株は集団として複製能を留めていた。
[0283]

102031

10、 実施例: BRP発現は弱毒化腫瘍標的サルモネラの腫瘍緩的化能または腫瘍阻害能を損なわない

以下の実施例は、弱毒化腫瘍線的細菌が1以上のエフェクター分子と共にBRPを発現するよう操作して細菌の胆瘍線的能を阻害することなくエフェクター分子の胆密への送達を 40 埋強することができることを示す。

102841

 102851

11. 実施例:pepTプロモーター発現運搬体

この実施的はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌におけるpepTプロモーターの制 の β の β の β の β で β で β の β で β で

[0286]

11.1 実施例: pepT-BRP-gGAL発現プラスミドの構築

pepTプロモーターは、以下のプライマー: フォワード:5' -AGT CTA GAC AAT CAG GCG AAG AAC GG-

3' (R) 3 - ACC CAT CCA CTC ACC CTC ACT TTT C-3'

リバース:5' -AGC CAT GGA GTC ACC CTC ACT TTT C-3'
(配列番号16)

を用いて、単離した野生型ネズミチフス菌 (ATCC14028) のコロニー由来の領域 のPCR増幅によりクローニングした。

[0287]

PCR条件は、95℃にて5分間を1サイクル、95℃にて1分間、65℃にて1分間、72℃にて2分間を35サイクル、および72℃にて10分間を1サイクルであった。このPCR産物をPCR2.1クローニングペクター(Invitrogen、Carlsbad、California)へクローニング、PepT/PCR2.1と名付けた。

[0288]

このPepT/PCR2. 1ベクターをNcoIおよびX baIで切断した。PepT断片をグルで単離し、同じ酸素で切断した β -gal Z termベクターへ連結した。Z term (Temporary Genbank Bankit No. 296495) は、 β GalオープンリーディングフレームをpUC19ペクローニングすることによって 40 作製されたプロモーターのない β -galブラスミドである。得られたプラスミドをpepT- β GALと名付けた。

[0289]

 示す。 【0290】

11.3 _ $p.e.p.T-gGALのin vivo ¹ <math>\odot$ ¹ \odot ¹

12. 実施例:テトラサイクリン誘導発現系

この実施例はサルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的細菌のtet プロモーターの制御下にある $\beta - g$ a l などのリポーター遺伝子をコードする核酸分子の発現を示す。 $\{0.29.21\}$

tetプロモーターは以下のプライマー:

フォワード:5'-GGA TCC TTA AGA CCC ACT TTC ACA TTT AAG-3' (配列番号17)

リバース:5'-GGT TCC ATG GTT CAC TTT TCT CTA TCA C-3'(配列番号18)

を用いてPCR増幅によりミニーTN10トランスポゾンからクローニングした。

[0293]

PCR条件は以下の漏りであった:95℃にて5分間を1サイクル、95℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて2分間を35サイクル、および72℃にて10分間を1サ 30イクル。

[0294]

~400 b p の P C R 断片をゲルで単標し、 P C R 2. 1 ペクター (In vitroge n) にクタローニングした。 P C R 2. 1 / tet プロモーターペクターを N c o I およの B a m H I で助 L た。 この ~ 400 b p の tet プロモーターペクターを N c o I およる で B a m H I で助 M L た。 連結 温 合物を 形質 転換 した 細菌 モア・オーター 2 0 エーターのない β ー g a l ペクター 2 ter m に 連結 に た。 連結 温 合物を 形質 転換 した 器 m 菌を デトラサイクリン / X ー g a l ブレート 上 心中 を 管 を と に 単値 した。 いくのかの B 使 コロニーからの 抽出 物を 作製 し、 B i r g e および L o w (1974、 J、 Mol Biol、 83:447 47 44 7 45 10 0 0 0 0 分 方法 に より ト・ラサイクリンの存在下の β ー g a l 活性 に 同して γ ー g a し 発現 に 同して γ ー c の を 団 の クローンを 単離 し、 一 定の 範囲の テトラサイクリン 濃度 に わたって β 一 g a l 活性 が 野 減されることを 示し、 図 1 4 に 示されて いる。 β ー g a l 活性 が 野 減されることを 示し、 図 1 4 に 示されて いる。

[0295] 12 宮体側・エンピフタチンを23項子は33

13. 実施例:エンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ南による腫瘍増殖 の阻害

以下の実施例はエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌の作製、および i n v i v oにおけるかかるサルモネラ菌による腫瘍治療の効果を示す。

【0296】 13、1 エンドスタチン発現プラスミドの議築 エンドスタチンは、以下のプライマー: 7*7-1:5' -GTG TCC ATG GGG CAC AGC CAC CGC GAC TTC CAG-3'(配列番号19) リバース: 5' -ACA CGA GCT CCT ACT TGG AGG CAG TCA TGA AGC T-3' (配列香号20) を用いてヒト胎盤cDNAライブラリーからPCR増幅した。 [0297] 得られたPCR産物をPCR2、1ペクター(Invitrogen)ヘクローニングし た。ヘキサヒスチジンーエンドスタチンは以下のプライマー: フォワード: 5' - GTG TCC ATG GCT CGG CGG GCA AGT GTC 10 GGG ACT GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT CAC AGC C AC CGC GAC TTC-3'(配列番号21) 9M-X:5' -GTG CGG ATC CCT ACT TGG AGG CAG TCA TGA AGC TG-3' (配列番号22) とともに、鋳型として上記で微築したプラスミドを用いてPCR増幅した。 [0298] PCR増幅条件は、95℃にで5分間を1サイクル、95℃にで1分間、55℃にで1分

. [0299]

(得られた産物はそのアミノ末端にペプチド配列MARRASVGTDHHHHHH (配列 番号 2 3)を有するヒトエンドスタチンをコードするNcoI(5))およびBamHI (3))刺尿部位を持つDNA所につあった。

間、72℃にて2分間を30サイクル、および72℃にて10分間を1サイクルであった

[0300]

このPCR産物をNcoIおよびBamHIで切断し、550bpの産物をゲルで単離し、同じ酵素で予め切断したpTrc99Aベクターへ連結した。この連結反応産物を大腸菌DH5aおび弱毒化腫瘍線的サルモネラ袜VNP20009へ形質転換した。
「03011

ハキサヒスチジンーエンドスタチンコード配列もまた、NcoI/BamHI断片として 発現ペタターYA3334はCpローエングした。YA3334はColEIの複製起点に 20 置き換えられた複製起点を有する(BazaralおよびHelsinki, 1970 Biochem 9:399-406) asdプラスミドPYA272(Curtis s III、米国特計等5、840、483号)である。陽性クローンから調製したプラス まじNAを単離し、サルモネラ棒8324へ形質転換し、これがasd変異を有する VNP2009である。この面珠はCurtiss III(米国特計第5、840、 483号)に記載の方法に従って作製した。

[0302]

13.2 回應化腫緩慢的サルモネラ菌によるエンドスタチンのin vitro競別pTrc99Aーペキサヒスチンンーエンドスタチンプラスミドを含む種々のサルモネヲ 菌VNP2009株はおよび大腸菌DF5 a株を対数増殖中期(0, D.s.。がへ0.40 をひいしの.8)まで増殖させ、この時点で各様機動を分割し、一方には1PTGは塩さなかった。さらに3時間増殖させた後、細菌抽出物を開製し、ヘキサヒスチジンーエンドスタチンの発現を抗ヒスチジン抗体(Clontech, PaloAlto, California)を用いてウエスタンプロット解析により能愛した。15Aおよび15Bはそれで抗助菌DH5 aおよびサルモネラ菌VNP2000男におけるアドで99Aーペキサヒスチジンーエンドスタナンの発現を抗ヒステンプンフェンドスタナンコンドスタナンコンドスタナンの発現を抗ヒステンコの発現をデオウエスタンプロットの結果を示している。trcプロモーターは1PTGの不在下の大腸菌では活性は見られなかったが、同プロモーターがサルモネラ菌では構造的に活性であったは活性は見られなかったが、同プロモーターがサルモネラ面では構造的に活性であった酸。ヘキサヒスチジンーエンドスタチンプンストスタンプロットの結果を示している。trcプロモーターは1PTGの不在下の大腸菌で、ヘキサヒスチェジンーエンドスタチンプロットの結果を示している。chずヒステンザン・エンドスタチンで現れ、たれがこの酸、ヘキサヒスチジン・エンドスタチンの発の中心であったが、のたりに活性であった。

(72)

合タンバク質の推定分子量である。

[0303]

ヘキサヒスチジン-エンドスタチン融合タンバク質は同様に、祭現の支配にもrcプロモ ーターを利用するYA3334プラスミドからも発現した。図16に示されているように 杭ヒスチジン抗体を用いて推定分子量25kDaのタンパク質を検出した。図16では、 サンプルが由来する全ての細菌溶薬物を0、1mM TPTGで3時間誘導した。 [0304]

13.3 C38ネズミ大腸癌に対するエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモ ネラ菌の効果

2×2×2mm³ の体積の大腸38腫瘍断片を9週齢の離C57BL/6マウスに皮下移 10 植した。腫瘍体積が1000mm®に達した際、それらを摘出し、2×2×2mm®の断 片に切断した。これらの断片をもう1回一連のサイクルを経させ、得られた2×2×2m m3 の断片を雌C57BL/6マウスの右腿に皮下移植した。腫瘍体積が150ないし2 00mm® に達した際 (移植後約24日後)、マウスを10個体6群に無作為に分け、各 群に異なる処理を施した。1つの対照際には0、2m1のPBSを施した。もう1つの対 照群には対照asdプラスミド (すなわち、上記第5. 6に記載のようにasdプラスミ ドは挿入されていない)を有する弱毒化腫瘍標的サルモネラ菌株VNP20009を1× 10° c. f. u. 含む0. 2mlを築した。第1の実験器にはasdプラスミドにおい てヘキサヒスチジンーエンドスタチン融合タンパク質を発現するVNP20009を1× 10° c, f, u, 含む0, 2mlを施した。第2の実験群には第1の群と同じ発現構築 20 物およびさらに発現されるBRPを育するVNP20009を施した。

[0305]

図17はこれらの実験の結果を示したものであり、ヘキサヒスチジンーエンドスタチンを 発現するVNP20009橡のよる腫瘍抑制の効果を示す。処理後60日では、エンドス タチンを発現するVNP20009サルモネラ菌の腫瘍サイズ中間値は、対照動物の腫瘍 サイズ中間値の約13%であり、空のベクターを担持するVNP20009サルモネラ菌 で処理した動物の腫瘍サイズ中間値より30%以上低かった。生き残った動物のうちの多 くが、正昧の腫瘍サイズの小さな変化によって示されるように腫瘍増殖にほとんど変化が 無いことを示し、あるものは強い腫瘍抑制を示した。処理の浸透または効果が不十分なこ とが、エンドスクチン送達系が不十分であることに反映されている可能性が最も高い。こ 30 のことは、エンドスタチンが封入体に集積することを見出しているO'Reillyら(1997, Cell 88:277-285) と合致する。エンドスタチン送達系はBR Pの発現によって増強される。BRPの発現はその天然プロモーターによって制御される が、通常は細菌でSOS応答を示す。BRP発現は対照集団の平均腫瘍体積の約6%まで 平均腫瘍体積を小さくすることが示された。さらに、ヘキサヒスチジンーエンドスタチン およびBRPで処理したマウス集団では、数個体のマウスが経時的に腫瘍体積に著しい減 少を示し、腫瘍体積は最初の腫瘍体積の約10以下まで退縮した。BRPの効果は二重で あると考えられ、1つはBRP自体が抗腫瘍活性を有すること、もう1つはBRPが周辺 細胞質内容物の放出、およびエンドスタチンをはじめ細胞質内容物の放出をある程度は促 進し、これが封入体でタンパク質が集積するのを防ぐということである。 [0306]

13.4 DLDヒト大腸癌に対するエンドスタチンを発現する弱毒化腫瘍標的サルモネ ラ菌の効果

対数増殖期まで増殖させたDLD1細胞培養物にトリプシン処理を施し、PBSで洗浄し 、PBS中5×10⁷ 細胞/m 1の懸濁液を再構成した。各々5×10⁶ 細胞を含む単一

の細胞懸濁液のアリコート0、1mlを9週齢の離ヌードマウス(Charles Ri verからのNu/Nu-CD1)の右腿に皮下注射した。マウスを各10個体3群に無 作為に分けた後、注射後10ないし15日、または鹽瘍体積が200ないし400mm® に達するまで同期化した。

[0307]

第1件のマウスは対照群であり、各々に0.3mlのPBS注射を施した。第2件のマウスには対照asdプラスミドを担持する弱悪化腫瘍繰的サルモネラ菌VNP2を0.0091× 10^{9} c. f. a. 6を0.3mlを施した。多さ群のマウスにはヘキサヒスチジンーエンドスタチン融合タンパク質およびBRPを発現するasdプラスミドを担持する 歌華化腫瘍機的サルモネラ菌VNP20009を 1×10^{9} c. f. a. 6を0.3ml を輸した。腫瘍をモニターし、1週間に2回瀬定した。図13は3処理の投与後の腫瘍体積をグラフで表したものであり、DLD1ヒト大腸癌の増殖に対する、ヘキサヒスチジンーエンドスタチンを発現する弱命化腫瘍繰的サルモネラ菌の抑制作用が示されている。 [0.308]

空のペクター P Y A 3 3 3 2 を担持する V N P 2 0 0 0 9 は腫瘍増殖を有意に阻害するこ 10 とはできなかった。しかし、エンドスクチンおよびB R P を発現する V N P 2 0 0 0 9 は 應募増殖を 図書する ことができた。これらの裁判は、エンドスクチンとB R P の組合せが P Y A 3 3 3 2 ペクターを担持する V N P 2 0 0 0 9 (8 3 2 4 株) のいずれかの抗腫瘍 作用を増加することを示している。

[0309]

14. 実施例: 弱毒化腫<u> 原格化腫 製</u>ドの来植例は、サルモネラ菌などの弱毒化腫瘍標的鋼面を、抗血管新生因子トロンポス ポンジンAHR、血小板第4因子およびアポミグレンを発現するよう操作するために用い られる方法論を示す。

[0310]

14.1 トロンポスポンジンAHRをコードする核酸配列を含むブラスミドの構築 トロンポスポンジンの抗血管新生相同領域(AHR)に相当するペプチド配列TiPl3 .40:AYRWRLSHRPKTGFIRVVMYEG(配列番号24)(例えば、 特許出明第C07K-14/78参照)を遊転操作し、サルモネラ菌での発現のためにコ ドンの至適化を行い、DNA配列:

GCG TAC CGC TGG CGC CTG TCC CAT CGC CCG AAA A CC GGC TTT ATC CGC GTG GTG ATG TAC GAA GGC (程列 音号25) を得た。このペプチドを合成するため相当的カリゴネクレオチド(オリゴ13:40-12)を作塾した。5、末端において、OMPAのプロセッシング領域をコードする配列および55pe I 刺慢部位を付加した。3、末端におい 70 て、BamHI制限部位とともに停止コドンを付加した。この2つのオリゴをアニーリングして二本領DNA断片を作製した。このDNA断片を5pe I/BamHIで頻斯し、5pe I/BamHIで頻斯し、5pe I/BamHIで頻斯し、5pe I/BamHIで頻斯へカラーアで801IL2に連結して、全長改変のmpAリーダー配列を含むプラスミドpTrc801-13.40を作製した。プロセッシングされると、この配列は完全長の13.40トロンポスポンジンペプチドとなる。

オリゴ 13, 40-1

5'gigtactagtgtgscgcaggcgGCGTACCGCTGGCGCCTGTCCCATCGCCCGAAAACCGCCTTTATCCGCGTGGTGATGTACGAAGGCTAAggatccgcgc 3' 配列委号 26)

オリゴ 13,40-2

5'gogoggateeTTAGCCTTCGTACATCACCACGCGGATAAAGCCGGTTTTCGGGC GATGGGACAGGCGCCAGCGGTACGC<u>cuctiqcaccact</u>agtacac 3' 個別報号 21)

(制限部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す) 【0312】

14, 2 血小板第4因子ペプチド (47-70) をコードする核酸配列を含むプラスミドの構築

血小板第4因子 (PF-4; 例えばMaioneb, 1990, Science 24 50

7:7-79およびJouanら、1999、 BLood 94:984 - 993を 配)のC末端のアミノ酸機基47-70からなるペプチドを、サルモネラ菌での発現のためにコドンの至適化を行った。以下に示されるこのペプチドは、CFU-GM始原棚施上 でPF-4の活性阻害に関与するDLQモチーフおよび主なペパリン結合ドメインである 塩基性アミノ酸クラステーを含む。

[0313]

血小板鄉 4 网子 ·

MSSAAGFCASRPGLLFLQLLLLPLVYAFASA
EAEEDGDLQCLCVKTTSQV
RPRHITSLEVIKAGPHCPTAQLIATLKNGRKICLDLQAPLYKKIIKKLLES
(原列委員 28)

10

タグナルペプチド=下線・太字 しする61、62、65、66=主なヘパリン結合ドメイン (太字) DLQ (7-9、54-56) = CFU-GM始原細胞に対する阻害活性 (太字) [10314] このペプチドを合成するため、相補的オリゴヌクレオチド (オリゴPF4-1およびオリ ゴPF4-2)を作製した。5' 末端においてOmpAおよびSpeI制限部位のプロセ シシング領域コードする配列を付加した。3' 末端において、BamHI側部位ととも に登止コドンを付加した。この2つのオリゴをアエーリングして二本類DNA網片を作製 20 した。制度別断した後、この断片をSpeI/BamHIで制限処理したペクターpTr を801に過去してプラスドラTr。801-PF4を作製した。プロセッシングされ ると、この配列は完全長のPF-4 (47-70)ペプチドとなる。

के मा ± PF4-1

5'crcacing/gigggggaACGGCCGCAAAATCTGCCTGGACCTGCAGGCGCCGCT GTACAAAAAATCATCAAAAAACTGCTGGAAAGCTAA ggalcc gcg3' 原列基準 29

オリゴ 994-2

5'cgcggatecTTAGCTTTTCAGCAGTTTTTTTGATGATTTTTTTTGTACAGCGGCGCCTG

(制限部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す) 【0 3 1 6】

14.3 アポミグレンをコードする核酸配列を含むプラスミドの構築

抗血管新生ペプチドアポミグレン
(IYSFDGRDIMTDPSWPQKVIWHGSSPHGVRLVDNYCEAW の
RTADTAVTGLASPLSTGK!LDQKAYSCANRLIVLC!ENSF
MTDARK(配列番号31); 別えば、国際公額WWO99/29856参照) はコラー
ゲンスVのタンバク質分解片であるレスチンのCx端に相当する。オリゴストレオチド
(オリゴApom5FおよびオリゴApom6F)を、ヒトゥDNA由来のDNA断片を
増幅するように設計した。5、末端において、OmpAのプロセッシング領域をコードす
る配列およびSpeI制限部位を付加した。3、末端において、BamH1制限部位とと
もに停止コドンを付加した。
[0317]

JP 2004-500042 A 2004.1.8

オリゴ AponSF: 5'- agotto actagi <u>glagogeagage</u>g ATATACTCCTTTGATGGTCG -3'(配列番号 32)

オリゴ ApomeR: 5'-cgg ggatecTTACTTCCTAGCGTCTGTCATGAAACTG-3' 仮列素号 23

(制腰部位はイタリックで示し、OmpAプロセッシング認識部位は下線で示す) 【0318】 正確なサイズの断片を、練型として船盤cDNAを用いてPCRによって得た。PCR産

物をSpeI/BamHIで切断し、改変ompAシグナル配列を含むSpeI/Bam HIで制限処理したベクターpTrc801に連結してブラスミドpTrc801-Ap omを作製した。プロセッシングされると、この配列はアポミグレンペプチドとなる。 [0319]

J. Immunol. Methods 65:55-63).
[0320]

図19および20で得られた子僧的結果は、サルモネラ菌によって産生された血小板等4 図子ペプチド(PF4-2)、トロンポスポンジンペプチド13、40(13、40-3) およびエンドスタチンが40ないし60%の抗増施活性を有すると思われることが示される。

[0321]

15. 実験例:弱春化腫瘍線的サルモネラ商によるパクテリオシンファミリーのメンバ 一の登録

この実施到はバクテリオシンファミリーのメンバーをコードする核酸を含む、サルモネラ 40 菌などの弱毒化腫瘍腫的細菌がパクテリオシンファミリーのメンバーを発現することがで 喜ることを示す。

[0322]

15.1 COLE3プラスミドの構築

本明細書に記載のプラスミドは本発明の特定の実施影態の例を示すものである。当業者に は明らかなように、trcプロモーターおよび/またはパクテリオシンをコードする核酸 のようなプロモーターおよび/またはエフェクター分子をコードする核酸は、当業者に公 知の方法によって他の適当なプロモーターまたはエフェクター分子と置き換えてもよい。 [0323]

15, 1, 1, pE3, シャトル-1 (shuttle-1) 中間体ベクタープラスミ 50

pB3.シャトルー1は、複数のクローニング部位及びブラスミドベクターCo1E3-CA38 (配列番号34) 中へのクローニング/選択のための1ac2断片を含むカセッ トを作製するために用いられる中間体ベクターを示す。BRPのE3へのクローニングを 容易にするために、BRPを先ず中間体シャトルベクター上にクローエングした(図21)。このベクターは、染色体 | ac Z中の突然変異(群)を有する細菌株中のラクトース に関してクローンを選択するために使用できる1ac2断片を含んでいる。次いで、BR P断片を、IacZα相補性断片を含むカセットとして、Ε3プラスミドSmaI部位(図22)中にクローニングした。1ac2断片によって、このステップにおけるインサー トの選択(すなわち、Lac+)が可能になる。天然に存在するE3プラスミドは、抗生 10 物質選択マーカーを有していない(図23)が、プラスミドの存在の選択は、ハローアッ 七イ (halo assay: Pagsley, A. P. 及びOudega, B. 、 コリシン類及びそれらのプラスミドの研究方法 (Methods for Studyin g Colicins and Their Plasmids)", [Plasmids, a Practica! Approach」 1987、K. G. Hardy編集; G ilson, L. ら、BMBO J. 9:3875-3884) を用いることによって 可能である。このシャトルベクターは、BRPのE3プラスミド上へのクローニングだけ でなく、E3又はE3/BRPと組み合わせうる征意のDNAのクローニングをも容易に するはずである。次いで、新規なE3/BRPプラスミドを、41。2、9中に形質転換 し、活性を試験した。予備的なハロー形成アッセイ (halo forming assa 20 ys) によって、プラスミド上のBRPの存在が、この株のB3を産生する能力を妨害し ないことが証明された。41.2.9 E3/BRPが、41.2.9 E3を超えて活性 を増大させたか否かを判定するため、各株によって産生されたE3の致死ユニット豊を測 定した(図24)。41.2.9 E3/BRPは、41,2.9 E3単独よりも100 %多い致死ユニットを産生し、これにより、この株が41、2.9 E3単独を超える増 大した活性を有することが証明された。 [0324]

15.1.2. E 3活性に関するハロー「空刺」アッセイ (halo "stab" a

1つのハローアッセイの結果を図25に示す。ある網菌棒がベトリ皿上の細菌巣(1 a w n) 上で増殖した恋受性棒の存在下でコリシンを分泌すると、分泌されたコリシンは、外 側側に広がり (d i f f u s e s o u t)、細菌巣中に含まれて心趣に調施機能を増し、それらを溶解して透明領域又はハローを作りだす。ハローの大きさは、分泌されたコリシン量に対応している。図25に示される結果は、多数の株を示している。0 1 E 3 ー 7 と 3 8 ブラスドを含んでいない 狭の回りには、ハローは絶対に観察されない。 8 博力 i n d u c t i o n) の不存在下では、コリシンはサルモネラ株によって産生される。また、種々のタイプの誘導剤(すなわち、アルキル化剤、紫外線、X線)によって、全てのハローは用要依存的にその大きさを増すという証拠がある。

[0326]

15.1,3. 選択的E3クローンのオーバーレイアッセイ

形質転換体を積々の希釈緑度 (1:10,000まで) でLB上にブレーティングし、3 7℃で2時間増殖させる。次いで、感受性試験株をハローアッセイで上記の様に調製し、 軟寒灭によってオーバーレイを注ぐ。10分間固化させた後、次いで、ブレートを逆さま にし、37℃で一晩インキュベートする。次いで、次の日に、透明領域の中央に小さなコ ロニー (又はコロニー群) を伴って、 (バクテリオファージのブラークに似た) 小さな透 明領域が現れる。

103271

「プラーク」又はハロー結製アッセイ

次に、上記のオーバーレイ寒天の透明領域の中心の小さなコロニーを、減菌したパスツー ルピペットを用いて単離する。目に見えるコロニーが無いか、又は1つのハロー中に複数 のコロニー群が有る場合のいずれかの場合には、ハロー全体を滅繭したパスツールピペッ トで吸い取る。コロニー又はハローを500µ1のLB中に移す。希釈(1:10,00 Oまで)を行い、LB寒天上に戻し、37℃で2時間増殖させる。次いで、オーバーレイ を上述した感受性試験株に注ぐ。次の日、コロニー群の全然又は殆どが、それらの同りに ハローを有するはずである。

[0328]

16. 実施例: E3のin vivo注射、及びサルモネラ中のプラスミド保持率 (%

下記実施例によって、in vivoでのサルモネラ中のcolE3-CA38プラスミ ドの保持を証明する。

[0329]

41.2,9 (又は41.2,9E3-CA38) のいずれかの注射の30日後の2匹の マウス由来の腫瘍及び肝臓のホモジェネートを、この研究に用いた。下記の記載中におい て、L=肝臓、T=腫瘍である。4つ全てのホモジェネートをCFUのためにプレーティ ングし、コロニー評をmgbB PCRによる分析及びコリシン産生のためにかきとった 41.2.9に類似するコロニーのほぼ純粋な培養物を全てのホモジェネートから得た 。それぞれから、5つのコロニーを、コリシン及びPCR分析のためにかきとった。さら に41.2.9 E3肝臓ホモジェネート中のコリシン産生体 (producers) 及 30 び非産生体の混合集団であるように見える30個のコロニーを、さらなる分析のために、 41.2.9 E3 T及びLプレートからかきとった。これらの結果に基づいて、41. 2.9 B3腫瘍及び肝臓由来のさらに100個のコロニーをかき取り、コリシン産生及 びmsbB PCRについて試験した。分布及びプラスミド保持率を組み合わせた日付 (combinded date) から算出した。

[0330]

in vivoでのE3注射、サルモネラ中のプラスミドの保持率(%)の測定の結果を 下記表3に示す。

[0331] [妻 3]

組織	CFU/ml	組織	CFU/gm	30% 陽性数	msbB PCR での陽性率 (%)	プ ラスミド 保持率 (%)
41. 29L	1. 07E+03	1. 33	4. 02E+03	0/5	100%	. 0/0
41. 29T	1. 26e+07	0. 26	2. 42E÷08	0/5	100%	n/a
41. 29E3L	l. 15E+04	2. 34	2. 46E+04	87/135	100%	64. 44
41. 29E3T	L 09e+06	0.35	1. 56E+07	134/135	100%	99. 26

[0332]

colE3プラスミドがin vivoで効果を育するようにするため、及びそれがin vivoで腫瘍部位に他の遺伝子を運搬するために、colE3プラスミドは、invivoで効力を有するように保持されていなければならない。エフェクターの纒的は腫瘍であるので、この実験で得られた結果は、驚くべきことであり、また利点を有し、従って、肝臓され自体への影響は少ないである。

[0333]

<u>17. 実施例:M27肺腫膨モデルでの種々の41.2、9.株の腫瘍腫的化</u> 下記実験によって、41.2、9 colB3及び41.2、9 colB3 BRP及び 41.2、9 colB3 BRP-m (改変BRP) サルモネラ株の腫瘍を標的とする能 力を証明する。

[0334]

下記表 4 に 列挙されたサルモネラ株を M 2 ア肺臓瘍を有する動物に注射し、動物を 7 日日に 儀 後にした。 履器 = 金 と、 c f u / 変の算出のために、次の日にアッセイした。 履器 / 近 所譲 の 上し、 n + を / からした。 /

[0335]

【表 4】

ゔ゚ゖ ープ	株	腫瘍 (T) 肝臓 (L)	cfu/g 組織	(腫瘍:肝臓)
1	41. 2. 9/E3	T	5. 1±1. 1×10 ⁸	131:1
1	41. 2. 9/E3	L	3.9±3.6×10°	
2	41. 2. 9/E3 BRP	T	4.6±2.7×10 ³	209:1
2	41. 2. 9/E3 BRP	L	2. 2±1. 3×10 ⁵	
61	41. 2. 9/E3BRP _p	Ť	3.5±0.15×108	90:1
63	41. 2. 9/E3BRP	1.	3 9+3 6×106	

30

1:BRP。とは、96位(GからAへの変異であり、グリシンからアルギニンへのアミノ政変化をもたらす)及び114位(TからAへの変異であり、セリンからスレオニンへのアミノ政変化をもたらす)での点突然変異を含む変変BRPをいう。突然変異体BRP。は、もはや同様の道解(Quasilysis)を起こさないが、まだ細菌からのタンパク質分泌能を有する(vander Wal, F., Koningstein, G., Ten Hagen, C.M., Oudega, B. 及びLuirink, J. 40。 (1998)、大腸面によるパクテリオシン放出タンパク質(BRP) 神パタンパク質物出の悪源化・タンパク質物出の悪源化・タンパクで動物出の悪源化・タンパクで動物の悪源化・タンパクでは、

質飲出の最適化:タンパク質放出から致死率及び同様の治解を切り継ずためのpCloDF13講導性BRP遺伝子の無作為突然変異(Optimization of Bacteriocin Release Protein (BRP) - Mediated Protein Release by Escherichia coli: Random Mutagenesis of pCloDF13-Derived BRP Gene to Uncouple Lethality and Quasi-Lysis from Protein Release), Applied and Environmental Microbiology, Vol. 64. np. 392-398)。

[0336]

50

18. 実施例:C38ネズミ大鵬癌への41、2.9/ColE3の効力

下記実施例によって、C38ネズミ大鵬癌の増殖を阻害する41.2.9/ColB3の能力を証明する。

[0337]

大勝38艦郵断片(2×2×2mm³)を、C57BL/6マウス(離、9週令)の皮下に埋め込んだ。艦藤の俸箭が1.000mm³に速した後、被菌条件下でマウスから鱈瘍を除去し、小さな断片(約2×2×2mm³/所片)に切断し、上記操作を5回場り返した。艦艇埋め込みの0日目に順線埋め込み針(tumorimplantation needle)を用いて、断片をマウスの石線膜の皮下に埋め込んだ。

[0338]

腫瘍体積が150~200mm³ に達したときに、動物をサルモネラ投与の0日目に無作 為化した。 棟結保存されていた41.2.9及び41.2.9/Co1E3を室虚で解析 し、PBSで輸択してそれを礼最終練足で.5×10° cfu/mlとした。0.2ml の細菌懸濁液のアリコート(1.5×10° CFU/マウス)を、0日目に記載のグルー ブのマウスに静脈内投与した。 細菌懸濁液を1×10° CFUまで条釈し、msbBブル定 ート上にブレーティングし、一晩インキュベートして、投与された細菌 cfuの数を測定 した。実験の終わりまで、週2回腫瘍を測定した。各グループ(Co1E3)の3つの腫 暴を解剖し、cfu及びプラスミドの保持率を測定するために処理した。 103391

グループ:

		マウス
1.	未処置コントロール	8
2.	4J. 2.9 (1.5×10 ⁶ /マウス)	8
0	41 0 0 // 100 / 1 5 / 100 /	

[0340]

41.2.9/C01E3のC38ネズミ大腸振への効力の結果を図26に示す。このデータは、VNP20009(41.2.9)の静脈内注射によって処置されたマウスがC38ネズミ大腸癌の増殖を有意に阻害することができることを証明している。さらに、マ5ウスをC01E3プラスミドを含有するVNP20009で処置すると、順夢退化(すなわち、隱夢が、実験の初めよりも実験の終わりの方が小さい)が達成された。
[0341]

<u>19、 実施例: ヌードマウス中のDLD1ヒト大腸癌に対するVNP20009/Co</u> IE3の**妨**腫瘍活性

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41.2、9に対するDLD1ヒト大腸癌の 増売を阻害する、サルモネラ突然変異体VNP20009/Co1E3(41.2、9/ Co1E3)の増大した能力を証明する。

[0342]

対数増殖(駅に増殖したDLD1 網胞をトリブシン処理によって除去し、PBSで洗浄し、 40 5×10 * 細胞人 mI PBS F構成した。細胞機 層液 (0, 1 mI) をヌードマウス (N u/Nu -C D1 uk 9 遅今; C h a r l e d R i v e r 社 より) の占線版に、0 目目に単回皮下注射した (5×10 * 細胞/ マウス)。10 匹の動物を各グループで用い、振瘍サイズが30~400 mm * に達する、腫瘍埋め込みの約10~15日 後に無作為化し、供試した(5×12 e d) で o 1 E 3 の と T Uを 1 日前に計数した。細菌 (41、2・9 反び 41、2・9 人で o 1 E 3 の と F Uを 1 日前に計数した。0・2 m l の 細胞 細胞 で p フェート (2×10 * C F U/ マウス)を、所定の日にマウスに皮下注射した。細菌溶液を 1×10 * C F U に希称し、各音液100 μ l を m s b B ブレート上にブレーティンダクし、ログプレートを一晩インキュペートした。次の日に細菌コロニーを対象した。 腫瘍 は、調2 50 プレートを一晩インキュペートした。 次の日に細菌コロニーを対象した。 腫瘍 は、 ii 2 50 で ii 2 で i

回測定した。 [0343]

グループ:

		マウス
1.	未処置コントロール (PBS)	10
2.	41.2.9 (2×106/マウス)	10
3.	41. 2. 9/Co1E3 (2×109/マウス)	10

ヌードマウス中のDLD1ヒト大腸癌に対する41.2、9/ColE3の抗腫瘍活性 10 の結果を図27に示す。コリシンE3含有41.2.9株は、41.2.9株単独に比べ て増大した活性を示す。

[9344]

20. 実施側:C57BL/6マウスのB16ネズミ黒色腫に対する41.2、9/C o 1 E 3 の効力

下記実施例によって、サルモネラ突然変異体41、2.9/ColE3の、B16-F1 0 黒色腫の増殖を阻害する能力を証明する。

[0345]

対数増殖期で増殖するB16-F10細胞を、トリブリン処理によって除去し、PBSで 洗浄し、5×10° 細胞/m! PBSに再構成した。細胞懸濁液 (0.1ml)をC5 7BL/6マウス (戦、9週令) の右脇腹に0日目に単回皮下注射した (5×10°細胞 /マウス)。10匹の動物を各グループで用い、腫瘍体積が150~200mm³ に差す る9日目に無作為化した。療結保存されていたサルモネラクローン41、2、9万が41 2.9/ColE3を室温で解凍し、PBSで希釈してそれぞれ最終濃度7、5×10 " c f u / m!とした。0、2m!の細菌懸濁液のアリコート(1.5×10°CFU/ マウス)を、9日目に所定のグループのマウスに静脈内投与した。細菌器湯液を1×10 * CFUに希釈し、msbBプレート上にプレーティングし、一晩インキュペートして、 投与された細菌 c f u の数を測定した。腫瘍は、実験の終わりまで调?何測定した。 [0346]

グループ:

<u>. </u>		マウス
1.	未処処置コントロール	10
2.	41.2.9 (1.5×10 ⁶ /マウス)	10
3.	41. 2. 9/ColE3 (1. 5×10・/マウス)	10

C57BL/6マウス中のB16ネズミ黒色鱶に対する41.2.9/Co1E3の効 力の結果を図28に示す。データは、41、2、9 (41, 2、9) による静脈内注射に よって処置されたマウスが、B16ネズミ黒色腫の増殖を有意に阻害できることを証明し ている。さらに、41、2、9/ColE3によって処置されたマウスは、41、2、9 40 単独に比べて早い時点 (最高37日まで) に腫瘍サイズの有意な減少を示した。より小さ い腫瘍サイズは、より容易に他の治療剤(例えば、化学療法剤及びX線などの照射)の影 響を受け易いので、この知見は非常に重要である。

[0347]

21. 実施例:BRPと組み合わせた41.2.9/E3の抗脂癌効力

下記実施例によって、サルモネヲ突然変異体41、2、9におけるBRPとB3の共祭規 が突然変異体の抗腫瘍効力を増加させることを証明する。 [0348]

サルモネラ突然変異体41.2.9におけるBRPとE3の共発現は、in vitro で細菌から分泌されるB3の量を増加させる。BRPがin vivoでサルモネラから 分泌されるE3の量を増加させうる場合には、この追加的な細胞外E3が暗瘍細胞に容易 に利用可能であり、従ってこれらの細胞に対する細胞悪性を増加させるという仮説を立て という仮説を立てしたができるであろう。この実験では、4つの動物グループ (グループ当たり10匹の動物)を試験した:

グループ番号	処置
1	コントロール (未処置)
2	41. 2. 9
3	41. 2. 9/E3
4	41. 2. 9/E3/BRP

16

この実験で用いたモデルは、ヒト肺癌系統ITB177とした。細胞を1日目にマウスの胎腹の皮下に埋め込んだ。脂嚢がおよぞ500mm*に達した14目目に、動物に上記表に記載の株の 1×10^6 cfu、又はグルーブ1の場合には生理食塩水を静脈内注射により注針した。飛瘍体積は、24日目まで毎週漁定した。表5の結果は、41.2.9が、42%で簡単強を狙響でも(49%阻塞)、一方、83との組み合わせは抗腫瘍効力を増大させる(63%)ことができることを示している。しかしながら、250万円の両者を有する株をこのモデルで用いた場合、抗腫物効力は365で増大し、42%に次で67%阻害)、増大した阻害率は、より早い時点で非常に有策である(差5)

【0349】 【表5】

表5:未処置コントロールと比較した腫瘍増殖卵害素(%)

株	17日日	20日目	24日目
41. 2. 9	5.0	3.8	4 0
41. 2. 9/E3	6.3	58	63
41 2 9/E3/RRP	9.7	8.2	6.7

[0350]

結論として、細胞無性コリシンE3及び機能強化された(enhanced)分泌系BRPの両者を有するサルモネラによる処置によって、未処置コントロール及び41.2.9 /B3単数での処質に比べて抗腫療動力が短加する。

[0351]

22. 実施例:コリシンE3含有サルモネラとX線処置との組合せ

下記実施例によって、41.2.9と2つの用量のX線との組み合わせが、X線単独で見られるよりもマウスの生存期間を有意に延長することを証明する。 【0352】

[0352]

スケジュールは次の通りである:0日目に、100匹のC57B6 雌マウス (5~7週令) の身体の中心 (midbody) の右側の皮下にB16F10 黒色腫 (5×10⁶ 細 ゆ胞/マウス)を投与することによって腫瘍を埋め込んだ。、8日目に、コリシンE3含有サルモネラ41・2、9を挫針し、12日目及び26日目に、X線を照射した。

[0353]

コリシンE3含有サルモネラとX線処置との組み合わせの結果を表6に示す。 【0354】

10334

【表 6 】

カテゴリー	n=()	lg t	で対	する	Ħ				平均	1/(ũ
A sham 15Gy	(6)	12,	12,	18,	18,	18,	21		17	1. (õ
J 156y X線 12dpt, 26dpt	(9)	14. 67.	14, 67	18,	21,	25,	35,	35,	33	1. 9)
K 41.2.9+15Gy X線 12dpt, 26dpt 退化 #1, 2	(9)	21, 60,		35,	35,	56,	60,	60,	47	2. 8	š
L 41.2.9/E3+15Gy X線 12dpt, 25dpt 退化 d32	(9)	28. 74,	39, 78	58,	56,	56,	60,	67,	57	3. 3	3

[0.355]

このデータは、41.2.9と2つの用量のX線との組み合わせが、X線単独で見られる よりもマウスの生存期間を有意に延長することを証明している。E3は、41、2、9+ X線で見られるよりもマウスの生存期間をさらに延長させた。 [0356]

23. 実施例: 順導標的細菌による細胞傷害性壊死因子の発現

下記実施例によって、腫瘍標的細菌による大腸菌細胞傷害性壊死因子 1 (CNF1) の発 現を証明する。

[0357]

細胞傷害性壊死因子としては、以下に限定されないが、大腸菌細胞傷害性壊死因子 1 (C NF1: Falbob, 1993, Infect. Immun. 61:4904-4 914) 、ピブリオ・フィシェリ (Vibrio fischeri) CNF1 (Lin 6. 1998, Biochem. Biophys, Res. Comm, 250;4 62-465) 及び大腸菌細胞傷害性壊死因子2 (CNF2; Sugais, 1999 Infect. Immun. 67:6550-6557) が挙げられる。また、C NFファミリーとしては、CNF2のN末端部分と、27%の同一の残差及び80%の保 存された残基を有するパスツレラ・ムルチオシダ(Pasteurella multi ocida) 毒素 (PMT) (Oswalds, 1994, Proc. Acad. S 30 ci. USA 91:3814-3818) も挙げられる。

[0.358]

CNF1は、大腸菌196 (ATCC 700336) から、標準的なPCRを用いて、 プライマー、 (フォワード) 5' -GTGTCATGAAAATGGGTAACCAAT GGCAAC-3' (配列番号35) 及び (リバース) 5' -CACAGAGCTCGC GCTAACAAAACAGCACAAGGGAG-3* (配列番号36) を用いたPC Rによってクローニングした。約3100bpの産物が得られ、タンパク質の発現並びに DNAクローニング宿主として大腸菌を用いるDNAシーケンシングのためにpTrc9 9aのNcoI及びSacI部位中にクローニングした。DNAシーケンシングは、エー ル大学ケックバイオテクノロジー研究室(Yale University Keck B iotechnology laboratory) の標準的な方法によって行った。D NAシーケンシングによって、クローン化PCR産物が、3065塩基対のうちの6つの ほんの小さな配列変異を有するCNF1であることを確認した。 [0359]

CNF1プラスミドを、大腸繭DNAクローニング宿主DHSaRびサルモネラVS16 46株(国際公開第WO99/13053号)中に電気穿孔した。標準的なLDHアッセ イ(Promega社製、マディソン、ウィスコンシン州、じytotox 96(登録 商標)) を用いて、大腸菌DNAクローニング宿主及びサルモネラYS1649株におけ るCNF1の発現を測定した。図29は、CNF含有プラスミドの存在が細胞毒性の増大 をもたらすことを示している。続くアッセイを用いて、CNF含有ブラスミドを有するサ 50 ルモネラが多核化 (multinucleation) (Ryckeb, 1990, J Clin. Microbiol, 28:694-699) などのCNF1の他の既知 の特性をも示すことを示した。CNF1に暴露したHela細胞の核を、光学頻酸鏡法に よって鉱域した。因30の結果は、サルモネラ中にCNF1が存在することによって期待 される多核及び細胞肥大(cell enlargement) がもたらされることを 明瞭に示している。

24. 実施例:腫瘍標的細菌によるベロ毒素の発現

下記実施例によって、ペロ毒素ABを発現するように違伝子操作された腫瘍標的細菌によって産生されるペロ毒素ABの細胞毒性を証明する。

[0361]

ペロ毒素(合成(8 y n.) HSC10毒素、シガ(Shig a)毒素、シガ様毒素、シグゲラ(Shigel1a)毒素)。この毒素は、コリシン産生大腸菌HSC10株から単腰されたものであり、元々はコリシンであると考えられていた(Farkas-Himsley5.1995. Proc Nati、Acad.Sci、92(15):6996-7000)。それは抗脳療活性、特に卵巣癌及び脳腫瘍に対する抗腫瘍活性の長い歴史をしているが、この抗腫瘍活性は、生きている細菌全体ではなく、精製された調製物と関係している。

[0362]

ペロ毒素を、ペロ毒素 I の公開されている配列に基づくブライマーを用いて大腸額HSC 20 10 (A T C C 5 5 2 2 7) からタローエングし、標準的なDNAシーナンシンダ法を用いて、エール・ケック・パイオテクノロジー・センター (Yale Keck Biotechnology Center)でのDNAシーケンシンダによって確認した。ペロ毒素の発現は、ペロ毒素A及びBサブユニットによる多シストロン性のテトラサイクリン誘導性プロモーターの制御下で、BRP遠伝テを用いて達成した。このテトラサイクリン誘導性色RPペロ毒素 A B を、m s b B 遠伝子を用いる染色体組み込みのためのペクター中にクローニングした。

[0363]

24.1. ベクターの構築

24、1, 1, ABの増幅及びクローニング

ベロ毒素AB(AB)は、下記プライマーを用いるPCRによって生成した:

H19B-7:フォワード: 5' -GTGTCCATGGCTAAAACATTATTA ATAGCTGCATCGC-3' (配列音号37):及び

QSTX-R1: " / (-x:5" -GTGTCTGCAGAACTGACTGAATTG

AGATG-3* (配列番号38)。 【0364】

また、これらのプライマーは、ptrc99AのNcoI及びPstI部位中にクローニングするための外側のNcoI(5°)及びPstI(3°)制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。

[0365]

24、1.2、 TetBRPの増幅及びクローニング

TetBRP-ABを、中間体ベクターpSP72-F6/R6中に構築した。TetBRPは、次のプライマーを用いてPCRによって生成した:Tet-5':フォワード5'ーGTGTAGATCTTAAGACCCACTTTCACATTAAGATCTTAAGACCCACTTTCACATTAAGATCCTTAAGACCCACTTCACATTAAGATCCTTACACAGGATCCTTACTGAACCGCGATCCCCCG-3'(配別番号40)。これらのプライマーは、pSP72-F6/R6ペクタクのBgIIIの形を加出「絡位中にフローニングするためのBgIII(5')及びBamHI(3')制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。
[103661]

5

30

24.1.3. pSP72-F6/R6-TetBRP中へのABのサブクローニング ptrc99A-ABを、pSP72F6/R6-TetBRP中に挿入するためにBa mHI及びAvaI制限エンドヌクレアーゼで消化してABを除去し、また、BamHI 及びAvaI制限エンドヌクレアーゼで消化した。pSP72F6/R6ベクターは、ト ランスで (in trans) lac Z-α相補性のためのβ-γal遺伝子の部分の他 に、クローニングのための複数の制限エンドヌクレアーゼ部位を含んでいる。ベクター(pSP72F6/R6-TetBRP)及びABインサートの両者は、0.8%1XTA Eアガロースゲル上で分離し、キアーゲン (Qiagen) ゲル抽出キットを用いて精製 した。T4リガーゼを用いて、ベクター及びインサートを連結し、熱ショック法を用いて DH5 a 大腸菌細胞中に形質転換した。この細胞を、100 μg/mlのAmp及び40 10 ия/m IのX-galを含有するLBプレートにプレーティングした。アンピシリン耐 性及び機能性3-ga1遺伝子の存在に基づいて陽性コロニーを選択した(陽性コロニー は青色だった)。 [0367]

24.1.4. nCDV442中へのTetBRP-ABのサプクローニング

pSP72F6/R6-TetBRP-ABを、pCVD442ペクター中にサブクロー ニングするためにNotI及びSfil制限エンドヌクレアーゼで消化し、また、Not I 及びS f i I 制限エンドヌクレアーゼで消化した。 [0368]

24.1.5. msbB染色体ベクター

VNP20009株の染色体中のDmshB遺伝子との相同組み換えを行うことができる ベクター (国際公開等WO99/13053号中のa. k. a. YS1646) を、自 殺ベクター p C V D 4 4 2 (D o n n e n b e r g 及びK a p e r , 1 9 9 1 . I n f ection and Immunity 59: 4310-4317) 中に構築した。2 つの別の産物としてVNP20009中に存在するmsbB欠損の5.及び3、側切片の 部分を生産する、PCR用のプライマーを設計した(msbB-5':フォワード5'-GTG TGA GCT CGA TCA ACC AGC AAG CCG TTA ACC C TC TGA C-3' (配列番号41) 及びリバース5' -GTG TGC ATG CG G GGG GCC ATA TAG GCC GGG GAT TTA AAT GCA AAC GTC CGC CGA AAC GCC GAC GCA C-3'(配列番号42):並び EmsbB-3':7+7-F5'-GTG TGC ATG CGG GGT TAA TT A AGG GGG CGG CCG CGT GGT ATT GGT TGA ACC GAC GGT GCT CAT GAC ATC GC-3' (配列番号43) 及びリバース5'-GTG TCT CGA GGA TAT CAT TCT GGC CTC TGA CGT T GT G-3'(配列番号44))。また、これらのプライマーは、これらの2つの断片 が共通のSphI部位を介して結合するときに、pCVD442のSacI及びSaiI 部位中へのクローニングを容易にするために、外側のSacI(5')及びAcaI(3 ")制限エンドヌクレアーゼ部位を含み、統生物質耐性を伴わない安定な染色体組み込み のためのDNA断片のDmsbB中へのクローニングを容易にするために、内部のNot I、PacI、SphI、SfiI、SwaI及びDraTを失成する (図31) 。この

ベクターを p C V D 4 4 2 - m s b B と呼ぶ (図32及び33を参照されたい)。

Tet-BRP-ABをpCVD442-msbB中にクローニングするために、Tet -BRP-ABプラスミドDNAを制限消化し、適当なDNAを精製し、T4リガーゼを 用いて、これら2つの構成要素を含む連結反応を行った。次いで、連結反応物をDH51 pirに形質転換し、コロニーをTet-BRP-ABの存在及び配向でスクリーニン グした。Tet-BRP-ABクローンをSM10 1 pir株(前記Donnenbe rg及びKaper, 1991) 中に形質転換し、そのプラスミドをpCVD442-Tet-BRP-ABと称した。SM10 1 pirのコロニーを、PCRによるTet -BRP-AB遺伝子についてスクリーニングし、サルモネラ株に対する交配ドナー (m 50 ating donor) として用いるために、SM10 1 pirクローンpCVD4 42-Tet-BRP-ABを選択した。pCVD442-Tet-BRP-ABを含有するSM10 1 pirを、標準的な方法 (Davis, R. W., Bottstein, D., 及びRoth, J. R., 1980, 最新細菌療法学 (Advanced Bacterial Genetics), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor になって、サルモネラマS50101株 (Difco MacConkey菜天に対する増強された所性を有するチトラサイクリン割性YS82株 (前記しめら、1999)の自然発生誘導体)と交配し、50μg/mLのカルベニシリン(carb)及び300μg/mLのストレブトマイシン(strep)を含むブレート上で選択した。得られたYS50102 10pCVD442-Tet-BRP-AB連伝子についてチェックした。

24.2. 41.2.9-Tet-BRP-AB株を生産するために染色体に組み込ま れたpCVD442-Tet-BRP-ABの41、2、9 (YS1546) 中への送達 ドナーとしてYS50102-Tet-BRP-AB株を用い、バクテリオファージP2 2 (突然変異体HT105/1 int-201; Davish, 1980) によって、 カルベニシリン耐性を41.2、9に形質導入した。pCVD442由来のhla及びs acB遺伝子の存在によって、DmsbB及びDmsbB-Tet-BRP-AB遺伝子 の両者を含む41、2、9-pCVD-Tet-BRP-AB-1を表すcarb*(又 20 はamp') suc* 株の選択が可能になる (図33、#3)。41、2.9-Tet-BRP-AB-1株をLBスクロース上にプレーティングし、suc' carb 誘導 体を選択し、DmsbB遺伝子を除去し、LB-スクロース寒天ブレートを、NaC1無 しで作製する以外は、前記Donnenberg及びKaper, 1991 (図33、 #4)の方法に従ってDmsbB-Tet-BRP-AB遺伝子を残し、ブレートを30 ℃でインキュベートした。これらのブレート上でコロニーが増殖した後、それらをmsb Bプレートにグリッドを据え(gridded)、航生物質及びスクロースマーカーの両 方を欠損したクローンの存在を検出するために、複製をカルベニシリン又はスクロースの いずれかを含有するプレートにプレーティングした。得られたクローンを、PCRにより Tet-BRP-AB遺伝子の存在についてチェックした。染色体に組み込まれたTet 35 -BRP-ABを含有し、スクロース感受性及びカルベニシリン耐性を欠損している1つ の誘導体を、41.2.9-Tet-BRP-ベロ崇素ABと表示した。 [0371]

操拳的なしDH細胞毒性アッセイ(Cytotox^{9.6} (登録商標); Promega社 製、マディソン、ウイスコンシン州)を用いてin vitroで41.2.9 - Tet - BRP-ベロ毒素ABの細胞毒性を試験した。結果を図34に示す。この結果は、 毒業発現クローン26及び31の毒性特性を証明している。クローン26及び31は、テ トラサイクリンで処理しなかったときよりもテトラサイクリンで処理したときの方が有意 に高い細胞毒性年(%)を有していた。 [0372]

25. 実施例: 脂瘍標的細菌による溶血素の発現

下記実施例によって、腫瘍標的欄菌を遺伝子操作して溶血素などの溶血性タンパク質を、 構成的に又は誘導性制御下で発現できることを証明する。

[0373]

溶血素は、赤血球調能を溶解させる能力を有する、周知の細胞無性タンパク質である(例 えば、Beutin, 1991, Med. Microbiol, Immunol. 180:167-182)を参照されたい)。SheA(Genbank青号ECO23 8954)は、殆どが野生塑大鵬面で見出される、通常は発頭されないサイレントな溶血 素である(Fernande25、1998、FEMS Microbiol Lett - 168:85-90)。SheA(A、k、A、hlyB:Genbank番号U5 50 7 4 3 0) は、野生型大腸菌 (2 5 0 7 株、ユール大学大腸菌遺伝子保存センター (Y a le University E. coli Genetic Stock Center))から、下記プライマー (フォワード) 5' -TTTTTTCCAT GGCTATTA TG ACTGAAATCG TTGCAGATAA AACGG-3'(配列番号45) 及び (リパース) 5' -TTTTTTAAGC TTCCCGGGTC AGACTTCA GG TACCTCAAAG AGTGTC-3' (配列番号46) を用いたPCRによっ て、標準的なPCR条件下でクローニングした。正しいサイズのPCR産物を、部分的に 構成性のtrcプロモーター下に置くために、ptrc99a(Pharmacia社製)のNcol及びHindlll部位中にクローニングした。また、PCR産物をNco I及びEcoRVによって切断したtet-bgal-Z-termベクター (前記) 中 10 にクローニングした。次いで、大腸菌DH5a(Gibco社製)を、そのプラスミドで 形質転換し、0.2×g/m1のテトラサイクリンを添加した及び添加しない血液寒天培 地(5%ヒツジ血液を有するトリプシン性ダイズ寒天暗地;BioMerieux牡製、 ロンパード、イリノイ州)にプレーティングした。溶血を示すコロニーの周りの透明なハ ローを含むコロニーを隔性コロニーとして取り上げた。陽性コロニーを標準的なプラスミ ド槽駅に付し、サルモネラYS501に形質転換し、再度ハローについてスクリーニング した。

[0374]

構成性のハロー形成を、テトラサイクリンの添加によって又は添加無しにハローが観察される、trc93条線換的について図35(2A及び2B)に示す。テトラサイクリンな2な存性ハロー形成を、チトラサイクリンの添加を仲わずにハローが観察されない、テトラサイクリンープロモーター影響性5heAについて図35(3A及び3B)に示す。これらの結果は、膃瘍(他の細菌が、精成的に又は誘導性制御下で、溶血性タンパク質を発現できることを証明している。

[0375]

26、 突施例: 腫瘍標的細菌によるメチオナーゼの祭現

下記実施例によって、サルモネラなどの弱毒化腫瘍標的細菌を遺伝子操作して、メチオナーゼを発現させることができることを証明する。

[0376]

メチオナーゼは、恒振増殖に必要な必須アミノ酸であるメチオニンを分解する酵素である 30。 職傷増殖を阻害するための又はメチオナーゼをコードするDNA若しくはウイルスペクターを投与するための精製メチオナーゼの投与に関しては報告されている(X u 及び T a nによる国際公開等WO00/29589号)。 X u 及び T a nは、メチオナーゼの送達のための喧響特異的軸面ペクターの使用方法を関示しておらず、精製タンパク質によって効力を達成するためには、大量のメチオナーゼが必要である。メチオナーゼを直接腫瘍に送達する新規な方法は、腫瘍操的細菌を用いて健素を発現させる。

[0377]

Genbank番号L43133に基づくニュードマス・ブティダ(Pneudomas putida)から、下記プライマーを、メチオナーゼ用に生成した:

フォワード: METH-XHOI

5'-CCGCTCGAGATGCACGGCTCCAACAAGCTCCCA-3'(配列番号47);及び

リバース:METH-BAM

5'-CGCGGATCCTTAGGCACTCGCCTTGAGTGCCTG-3'(配列番号48)

上記列等したプライマー(4 mM)及び跨型として、ニュードマス・プティダの単離され たコロニーを用いて、メチオナーゼの原列を下記条件下でのPCRによって増幅した: 9 4 ℃、5 分間を1 サイクル、次いで9 4 ℃に7 1 分間、6 0 ℃にて1 分間及び7 2 ℃で 2 分間を3 5 サイクル。7 2 ℃、1 0 分間の最終増幅工程は、PCR反応の最後の工程と して行った。P CR産物を0・8 名 1 × T A B ア ガロースゲル上で分離し、メナオナー 知 ゼの予想されるサイズ (約1196bp) からなるPCR産物を同定した。バンドを、ゲルから切り取り、キアーゲンゲル軸出キットを用いて精製した。

ルから切り取り、キェーケンケル抽出キットを用いて箱: 【0378】

nSP72ベクター及び上記で得られた単離したゲル精製メチオナーゼ遺伝子の両者を制 限酵素×ho I及びBam HIで消化した。消化したベクター及びメチオナーゼを、0 8%1XTABアガロースゲル上で分離した。線状化ベクターに対応する消化生成物及 び消化されたメチオナーゼ遺伝子をゲルから切り取り、キアーゲンゲル抽出キットを用い て精製した。線状化ベクター及びインサート (メチオナーゼ) をT4リガーゼを用いて― 縮に連結した。連結混合物を、熱ショック法によってDh5 a大腸菌細胞中に形質転換し た。細胞を、回収した後、100mg/mLのアンビシリン (Amp) を含有するLB培 10 地にプレーティングして、完全なpSP72ベクターを含有する細胞を選択した。Amp 耐性コロニーを同定し、キアーゲンミニープレップキット(Qiagen mini-p rep kit)を用いたプラスミド調製並びに酸素Eco RI及びBsp HIによる 制限消化によって、メチオナーゼ遺伝子を含有するnSP72ベクターの存在を確認した 。クローン#9を、配列決定のために、エール大学医学部(Yale Universi ty School of Medicine) のエール・シーケンシング・ファシリティ - (Yale sequencing Facility) に送った。SP6 (フォワード) 及びT7(リバース)シーケンシング・プライマーの両者を用いて配列決定がなされた 。結果は、配列が、PCRによってTAAに変わっているTGA停止コドンを除いて、公 表されているメチオナーゼの配列と100%一致することを証明している。 [0379]

メデオナー - 七浩性は、Horiち, 1996, Cancer Research 56: 2116-2122に記載のメチオナーゼアッセイを用いて測定できる。 【0380】

27. 実施例:弱悪化腫瘍標的細菌でのTAT融合物としてのアポチン(apoptin)タンパク質の発現

下記実施例によって、弱毒化腫巣機の細菌を遺伝子操作して、エフェクター分子、並びに TAT、アンテナペディア (antennapedia)、VP22、及びカボジ(Ka posi)FGF MTSなどのフェリー・ペプチド(ferrypeptide)を含 む融合タンパク質を発視させ分泌させることができることを証明する。 「0381」

27.1. TAT-アポチンペクターの構築

カナリア・ウイルス(CAV)タンパク質であるアポチンは、アデノウイルスペクターに よって透達されたときに、新生物細胞中でアポトーシスを誘導することが知られている(例えば、Notebornら、1999、Gene Therapy 6:882-89 2を参照されたい)。

[0382]

サルモネラの細胞質中で転写されるが、腫瘍細胞の核に輸送され、アポトーシスを引き起こす能力を有するランパク質を生産するために、アポチンタンパク質をとたりに、Sch4ルス(HIV) TATタンパク質から誘導されるペプチドに融合した(例えば、Sch4wartzeら、1999、Science285:1569-2572を参照されたい)。TATタンパク質融合物は、正電荷を増加させ、タンパク質精整を容易にもするたい)。TATタンパク質融合物は、正電荷を増加させ、タンパク質精整を容易にもするがリヒスチジン(ヘキサヒスチジン)アミノ酸と融合した場合に、機能性であることも示されているので(前記Schwartzeら、1999)、TATーアポチン融合物を、ヘキサヒスチジンによって及びそれ無しで生産した(図36A及びB)。さらに、TATーアポチン融合物は、OmpA-8Lシグナル配列によって及びそれ無しに生産できる(図36A及びC)。

[0383]

アポチン及びヘキサヒスチジン・アポチンは、オーバーラップ・オリゴヌクレオチドを用いて構築される。アポチンをコードする核酸配列は、下記オリゴヌクレオチドを用いるP 50

CRによって生成した:

CCGGGCCCC-3'; 配列番号 55

TAPI: 5'- GATCCCATGG CTTATGGCAG AAAAAAAACGC CGTCAGCGCC GTCCCATGAA CGCGCTGCAG GAAGATACCC CGCCGGGCCC GTCCACCGTG TTTCGCCCGC CG-3'(記列發号 49)

TAP2: 5'- GGGACAGGGT GATGGTGATG CCCGCGATGC CGATGCGGAT TTCGCGGCAA TGCGGGGTTT CCABCGGGCG GGAGGAGGTC GGCGGGGGAA ACACGGTGGA CGG-3' (配料森長 50)

TAP3: 5'- GGCATCGCGG GCATCACCAT CACCCTGTCC CTGTGCGGCT GCGCGAACGC CCGCGCGCCG ACCCTGCGCT CCGCGACCGC GGATAACTCC GAAAACACCG GC-3 (配列番号 51)

TAP4: 5'-GCGATATTCG GACGGATCGC AGGAGCGTTT TTTGGACGGC GGTTTCGGCT GATCGGTGCG CAGATCCGGG ACGTTTTTAA AGCCGGTGTT TICGGAGTTA TCCGCGGTCG C-3'(前列森号 52)

TAPS: 5'-CCTGCGATCC GTCCGAATAT CGCGTCTCCG AACTGAAAGA ATCCCTGATC ACCACCACCE CGTCCCGCCC GCGCACCGCC CGCCGCTGCA TCCGCCTCTG AAAGCTTCAT G-3' (MPXII 66 FG 53)

TAP6: 5'-CATGAAGCTT TCAGAGGCGG ATGCAGCGGC GGGCGGTGCG C-3' (原)/(香膏 54)

TAP 2-TAP6オリゴヌクレオチド及びTAP6H1オリゴヌクレオチド (5'-GATECCATGG CTCATCACCA TCACCACCAT TATGGCCGCA AAAAACGCCG TCAGCGCCGT CGCATGAACG CGCTGCAGGA AGATACCCCG

を用いて、TAT-アポチン融合タンパク質のヘキサヒスチジン含有バージョンをコード する核酸配列を生成した。TAP6オリゴヌクレオチド及びomp 8 L F1オリゴヌクレ オチド

(5'- GATCCCATGG CTAAAAAGAC GGCTCTGGCG CTTCTGCTCT TGCTGTTAGC GCTGACTAGT GTAGCGCAGG CCTATGGCCG CAAAAAACGC CGTCAGCGCC -3': NP 明華 長 58

を用いてPCRにより、TAP1-TAP6オリゴヌクレオチドのPCR産物から、TA Tーアポチン融合タンパク質のOmpA8L含有バージョンをコードする核酸配列を生成 した。 [0384] 各オリゴヌクレオチドを、 4μ M濃度の保存溶液に調製した。子の混合されたPCR反応 ビーズ (Pharmacia社製、Ready-to-go beads) を用い、各オ リゴヌクレオチドの2×1を使用した。PCR反応は、95℃で5分間を1サイクル:9

5℃で1分間、60℃で1分間、72℃で1分間を35サイクル;及び72℃で10分間 を1サイクルから構成されていた。次いで、PCR産物を、フェノール/クロロホルムで 50

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N... 9/17/2007

30

(89)

構出し、エタノールで沈瞭させ、水中に再び溶解し、Nco I及び目ind IIIによる制限消化に付した。制限消化されたPCR産物を、ゲル電気泳動によって分離し、正しいサイズの産物(TATーアボチン及びヘキサヒスチジンーTATーアボナンはりて、それぞれ約420及び450hp)をゲルから切り取り、標準的な分子生物学的方法を用いて単離した。これらの産物をNco I及びFind III消化されたpirc99a 「日午日本「中国 ci a社類」中に連結し、ptrc99a 「TATーアボナン(図37)及びヘキサヒスチジンTAT-アボテン(図38)の両者の正しいDNA配別を得た。

27、2. TAT-アポチンの分泌及び取り込みの証明

野帯化腫瘍操的細菌を、当業界で公知の操準的を方法によって(例えば、熱ショック又は 電気穿孔によって)ptrc99aTAT-アボチン構築物によって形質転換し、培地 中で培養する。当業者に公知の方法(例えば、ウエスタンブロット分析又はむし15名) を用いて、TAT-アボチンの存在について、細菌培養物からの上清を試験する。」旦、 調菌培養地の上清中のTAT-アボチンの存在が強されたなら、調管培養上清を観見動 物細胞(例えば、NIH3T3、CHO、293、及び293T細胞)と共にインキュペートし、細胞内部のTAT-アポチンの存在が鑑ける。
「細胞する。

[0386]

27.3. 腫瘍内へのTAT-アポチンの取り込みの証明

TAT-Tボチン又はアポチンを発現するように滝伝子操作された弱毒化鹽祭標的網菌を 患 B16脛瘍モデルに静峡内投与する。マウスは、細菌の分号後数日で機性にし、解器連 を測定する。当業者に公加のアポトーシスアッセイ (例えば、D NA ラダー)ング (D NA Iaddering) 及びコルオレセインin situ細胞死候出キット (Boe hringer Mannem 加型架、マンハイム、ドイツ) を用いてTAT-アボチ ン又はアポチンの存在及び扇在について膨鳴をアッセイする。さらに、腫瘍のサイズをア ッセイし、TAT-アポチンの抗腫瘍活性を測定する。また、腫瘍をホモジェネートし、 ブレーティングして、コロニー形成単位(c.g・u・)を測定する。

1000/1 28. 実施例:マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009と化学療法剤との 39 組合せの効力

<u>組合せの効力</u> 下記実施例によって、化学療法剤と組み合わせた弱毒化腫瘍係的細菌の投与が、相乗的又 は相加的に働いて、肺癌などの周形腫瘍の増殖を阻害できることを証明する。

[0388]

28、1. マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009とサイトキサン(c y

toxan) 又はVNP20009とマイトマイシンCとの組合せの効力

液体窒素保存されたM27キズミ肺癌細胞 (1×10°/m1×1m1)を、37℃で細胞を素率く解凍することによって正常な状態に戻し、37℃、5%CO』で10%ウシボー (10%ウェールで10%変した。細胞を2世代維代させた株、対数増殖網にあるM27細胞をトリプシン処理によって取り出し、1×PBSで (2%)をした機能機の込みのために、1×PBSで2、5×10°細胞/m1に再構成した。M27細胞糖溶液、0日目に、100匹のC57BL/6マウス(幟、8週令、20g:5×10°細胞/マウス)の右脳膜の皮下に埋め込んだ。マウスを、各グループが10匹のマラスからなるように、無性為に10のグループに分けた。

[0389]

サルモネヲVNP20009株を、本瑩明者の精準的な希釈方法によって、1×PBSで 5×10°CFU/m1に希釈した。各マウスに、下記表もに従って12日目に、希釈したサルモネヲ(1×10°CFU/マウス)0、2m1を静脈内投与した。注射した細菌の実数を調定するため、5×10°CFU/m1の欄菌懸膚液を、さらに1×10°CFU/m1に高線のは、労争疾で対域 M4、Bオンレートシ国際公開をW099/13053 20

号)上にブレーティングした。形成されたコロニーを翌日計数した。 【0390】

マイトマイシンC (Sigma社製) 及びサイトキサン (Sigma社製) を、下記表7 に従ってマウスに按与した。マイトマイシンCの2回目の用量を22日に組み合わせケケ ループには投与しなかった。VNP20009+サイトキサンで処置したグループ な単な中華で広が観察されたので、シブロ(Cipro;Bayer Inc. 社製、 ウエストハーペン、コネチカット州)200mpkを、VNP20009単独又はVNP 20009+化学療法剤で処置した名マウスに投与した。実験の終わりまで、腫瘍体積を 週2回測定した。動物の行動、外観及び死亡率を毎日観察した。マウスは、清潔で、一定 10 温度の来除室に保持した。床敷きを週2回取り換え、マウスには十分な食物と飲料水を与 えた。

[0391] 【表7]

グループ	マウス数
未処置コントロール	10
3 mpk マイトマイシン C、静脈内、15日	10
5 mpk マイトマイシン C、静脈内、15 日	10
150 mpk サイトキサン、腹腔内、15 日	10
200 mpk サイトキサン、腹腔内、15 日	10
VWP20009、1×10%マウス、静脈内、12 日	10
VVP20009、1×10 ⁵ /マウス、静脈内、12 日÷ 3 mpk マイトマイシン C、静脈内、15 及び 22 日	10
VNP20009、1×10"/マウス、静脈内、12 日+ 5 mpk マイトマイシン€、静脈内、15 及び 22 日	10
VNP20609、1×105/マウス、静脈内、12 日+ 150 mpk サイトキサン、腹腔内、15 日	10
VNP20009、1×10°/マウス、静脈内、12 日+ 200 mpk サイトキサン、腹腔内、15 日	10

[0392]

図39に示すように、VNP20009キサイトキサンによる組み合わせ処理は、VNP20009処理準無又はサイトキサン処置単独まりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。 図40にデナように、VNP20009キマイトマイシンCの組み合わせは、マイトマイシンC9組みられるとでは、サイトマイシンC9組みられると7肺癌の増殖を強く阻害した。しかしながら、VNP20009サマイトマイシンCの組み合わせは、VNP20009処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害しなかった(図40)。これらの結果は、化学療法剤と組み合わせた影響化腫影機助棚面の授与が、相果的又は相加的に働き、肺癌などの固能腫瘍の増殖を阻害できることを示唆している。

[0393]

28.2. マウスのM27肺癌の増殖に対するVNP20009とシスプラチンとの組合せの効力

液体窒素保存されたM 2 7 ネズミ肺癌細胞(1×10°/m1×1m1)を、3 7 ℃で素早く網胞を解棄することによって正常な状態に戻し、3 7 ℃、5 %C O」でウシ胎仔血清(FCS)を含有するDM B M培養培出 2 5 m 1 で考慮した。銀程を2 世代様ださせた後、対数増殖期(約90~95 % 段和)にあるM 2 7 細胞を、トリプシン処理によって取り出し、1×PB S で洗浄し、細胞/出し、1×PB S で洗浄し、細胞/加・1×PB S で洗浄し、細胞/の・2 m 1 × P B S で 洗浄した。M 2 7 細胞を | 1×P B S で 洗浄した。M 2 7 細胞を | 1×P B S で た。3 6 匹の C 5 7 B L 列

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N... 9/17/2007

40

✓ 6マウス (株、8週令、20g:5×10°細胞/マウス)の右腺腺の皮下に埋め込んだ。マウスを、各グループが9匹のマウスからなるように、無作為にグループ分付した。 [0394]

ペンジャット サルモネラVNP20009株を、本発明者の標準的な希釈方法によって1×PBSで5×10°CFU/m1に希釈した。下記表8に従って12日目にサルモネラ(1×10°CFU/でクス)0、2m1を、各マウスに尾静脈を由で投与した。注射した網面の実数を環定するために、5×10°CFU/m1の細面懸濁液を、1×10°CFU/m1にさらに添載し、MsBbプレート上にプレーティングした。影成されたコロニーを専日計

数した。 【0395】

郷苗注針の2日後の14日目に、マウスにシスプラチンを投与した(下記表8)。シスプラケンを、投与前に、正常生理食塩水で0.5mg/m1に希釈した。腫瘍体積は、実験の終わりまで過2回頭定した。動物の行動、外類及び死亡率を毎日観察した。マウスは、清潔で、一定温度の実験室内に保持した。床敷きは過2回取り換え、マウスには十分な食物と飲料水を与えた。

[0396]

【表8】

グループ	マウス数
コントロール(未処置)	9
YNF20009、1×10Vマウス、静脈内、12 日	9
5 mpk シスプラチン、腹腔内、qw×2、14,19 日	9
NP20009、1×10 ⁸ /マウス、静脈内、12 日+ 5 mpk シスプラチン、腹腔内、qw×2、14, 19, 33 日	9

[0397]

図41に示すように、VNP20009キシスプラチンによる組み合わせ処置は、VNP20009処置単独又はシスプラチン処置単独よりもM27肺癌の増殖を強く阻害した。 これらの結果は、シスプラチンなどの化学療法剤と組み合わせた現悉化腫瘍腫の細菌の投 与は、根系的又は相加的に働き、耐癌などの固形腫器の増殖を阻害できることを示唆して 30%のある。

[0398]

本発明は、本明細書中に記載された特定の実施態様によってその範囲を限定されるものではない。 実際に、先行する記載及び添付の図面から、本明細書中に記載されているものの他に、本発明の多様な変形が存在することは、当業者には明らかであろう。そのような変形は、特許請求の範囲内に入ることを感りする。

[0399]

種々の刊行物が本明編書中で引用されており、それらの開示は、参照によってそれらの全体が本明編書中に組み入れられる。 「図面の雑当な税明」

[図1]

成熟ヒトTNFーαのコード配列を示す図である。DNA配列(配列番号3)とタンパク 質配列(配列番号4)の両方を示す。

[図2]

サルモネラVNP20009 serC株の誘導を示す図である。

[জুব]

ネズミチフス菌における、染色体に組み込まれた t r c プロモーター駆動TNF - α 遺伝 子からのTNF - α 発現を示す図である。

[[A]

成熟ヒトTNF-a(ヌクレオチド67-543)との合成OmpAシグナル配列 (ヌク 50

レオチド1-63)融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配 列(配列番号7)とタンパク質配列(配列番号8)の画配列を示す。

[図5] 大腸菌(JM109株)におけるOmpA/TNF-α融合タンパク質の周辺細胞質局在

化およびプロセシングを示す例である。

[図6]

成熟ヒトTRAIL (ヌクレオチド67-801) との〇mpAシグナル配列 (ヌクレオ チド1-63) 融合物のコード配列を示す図である。融合構築物についてのDNA配列 (配列番号9) とタンパク質配列 (配列番号10) の両配列を示す。

[図7]

大腸菌(JM109株)におけるОmpA TRAIL融合タンパク質の発現およびプロ セシングを示す図である。

[図8]

成熟 (C125A) ヒトIL-2 (ヌクレオチド64-462) との修飾Omp Aシグナ ル配列(ヌクレオチド1-63)融合物のコード配列を示す図である。融合構築物につい てのDNA配列(配列番号11) とタンバク質配列(配列番号12)の両配列を示す。 [図9]

phoA (8L) またはompA (8L) 合成シグナルペプチドに融合した成熟ヒトI L-2の祭現およびプロセシングを示す例である。

[図10] 成熟 (C125A) ヒトIL-2 (ヌクレオチド64-462) との修飾phoAシグナ ル配列(ヌクレオチド1-63)融合物のコード配列を示す図である。融合機築物につい てのDNA配列(配列番号13) とタンバク質配列(配列番号14)の両配列を示す。 [関11]

ヒトTNF-aの成熟形態を発現するネズミチフス菌弱毒化株のin vivo抗腫瘍効 力を示す図である。

[図12]

BRP発現がin vivo抗腫瘍効力に及ぼす影響を示す図である。同図は、(1) P BS対照: (2) VNP20009: および (3) BRP遺伝子を含む pSW1プラスミ ドを保有するVNP20009で治療した、B16黒色腫を有するC57BL/6マウス 30 集団の時間経過に対する平均腫瘍サイズを示したグラフである。

[図13]

サルモネラにおける、pepTプロモーターの制御下でのB-gal遺伝子発現の鎌気性 菌誘導を示す図である。図13Aは、2株のサルモネラ、YS1456およびVNP20 009の嫌気性条件に応答するβ-gal発現のin vitro誘導を示す図である。 図13Bは、BRP、β-gal、もしくはBRPとβ-galを発現するVNP200 O 9 サルモネラの、腫瘍対肝細胞におけるβ-galのin vivo誘導を示す図であ 30

【図14】

サルモネラにおける、Tetプロモーターの制御下でのβーgal遺伝子発現のテトラサ 40 イクリン誘導を示す図である。用量応答は、約0.15μg/m1の濃度までテトラサイ クリンに対し線形応答を示すが、これを超えると、応答の低下がみられ、これは恐らく、 テトラサイクリンの抗生物質作用によるものと考えられる。

【図151

pTrc99aベクターからのヘキサヒスチジン-エンドスタチン(ヘキサHiS-エン ドスタチン) 発現を示す図である。図15Aは、サルモネラ (VNP20009) に形質 転換させた3つの独立したクローンからのヘキサHiS-エンドスタチンの発現を示す図 である。図15日は、大腸菌(DH5g)に影質転換させた5つの独立したクローンから のヘキサHIS-エンドスタチンの発現を示す図である。偶数番号のレーンは、非誘導塔 養物からの抽出物を、また、奇数番号のレーンは、対応するIPTG誘導結業物からの抽 59 出物をそれぞれ示す。

[12] 1 6]

プラスミド¥A 3 3 3 4 からのへもサHIS - エンドスタチンの発現を示す園である。 a s d R (trcプロモーターを用いる) におけるペキサHIS - エンドスタチンは、抗ヒスチジン抗体を用いたウェスタン分析によりペキサFIS - エンドスタチン (~25kD)の適正サイスのパンドを発現することができる。

[図17]

○38マウス大腸癌に対するエンドスタチンを発現するVNP20009細胞の効力を示す図である。同図は、(1)PBS対照:(2)空のYA3334ペクターを保有するaad ̄VNP20009;3)へキャレスチジターエンドスタチンを発現する名。d ̄VNP20009;および(4)へキサヒスチジンーエンドスタチンとBRPを発現するVNP20009でそれぞれ治療した、確立されたС38腫瘍を有するマウス集団の時間を選出け対する平均偏振サイズを示すグラフである。

図18]

DLD1ヒト大腸癌に対するエンドスタチンを発現するVNP20009線配の効力を示す回である。同図は、(1) PBS対照: (2) 空のYA3334ペクターを保育する a s d ~ VNP20009; および (3) ヘキサヒスチジンーエンドスタチンとBRPを発現するVNP20009; および (3) へれせにスチジンーエンドスタチンとBRPを発現するVNP20009でそれぞれ治療した、確立されたDLD1腫瘍を育するヌードマウス集団の開酵差点は対る平均腫瘍サイズを示すクラフである。

[图19]

内庭細胞に対するヒトエンドスタチンを発現する弱等化腫瘍揺的サルモネラからの溶解物 の抗増縮活性を示す図である。同図は、bFGFおよび8 × 10°細菌に相当する溶解 物に応答するヒト静峡内皮細胞(HVEC)増施の阻害を示す。対照として、空のpT rcペクターを含むサルモネラを使用した。各データの点数は、4回反復して行なった代 表的実験がの平均値である。サンブルを細菌数で基準化した。

[図20]

内皮細範に対する血小板第4 图子ペプチド(血小板第4 图子のアミノ酸47 — 70) およびトロッドスポンジンペプチド(13、40)を発現する弱毒化腫瘍標的サルモネラからの各解物の抗増殖性性を示す関である。同図は、bFGFおよび8 x 10 ⁶ 細菌性相当する溶解物に応答するとト酵脈内皮細胞 (HUVBC) 増殖の阻害を示す。対照として、20空の月下にベグターを含むサルモネラを使用した。各データの点数は、4回反復して行なった代表的実験からの平均値である。サンブルを細菌数で基準化した。

图21]

p E 3. シャトルー 1 ベクターの構築を示す図である。 【図 2 2 】

CO 1 E 3 - C A 3 8 ペクター (Gen Bank 登録書号AF129270) の構築を示す図である。Co 1 E 3 - C A 3 8 ペクターのヌクレオチド配列を配列番号1に示す。Co 1 E 3 - C A 3 8 ペクターは、配列番号2~5にそれぞれ示すように、5つのオープンリーディングフレームを含む。

[图23]

Col E3-CA38/BRP-1ペクターの構築を示す図である。

【図24】 各株によって産生されたコリシンE3の教死単位の量を示す棒グラフである。

[図25]

紫外線またはX線に暴露された各種菌枠についての Λ ロー(halo) アッセイを示す図である。

[图 2 6]

C38マウス大腸癌に対する41.2.9/Co! E3の効力を示す図である。

NU/NuマウスにおけるDLD1ヒト大腸癌に対する41、2、9/Co1/E3の抗 50

腫瘍活性を示す図である。

[図28]

B16マウス黒色腫に対する41.2.9/Col E3の効力を示す図である。 【図29】

クローン化大腸菌CNF1を発現するサルモネラの細胞毒性を示す図である。

[M 3 0]

C NFに暴露されたHeLa細胞(A)は、正常なHeLa細胞(B)と比べて、腫脹および多核形成を示す。 「図31】

3'から5'方向(図32のマップからわかるように)のpCVD442-msbBペク 19 ターのmsbB部分を示す図であり、該部分は、msbBの中央に欠失を有し、かつその 箇所に内部Not1、Pac1、SphI、SfiI、SwaIおよびDraIポリリン カーを含む(配列書号61)。図32参照。

[図32]

Dms b B 部域にDNAをクローン化し、続いて来色体に挿入するためのpCVD442ms b B・ベクターの側限マップおよび義略図である。Ms b B d e l は、Dms b Bの5 3 3 よび3 領域であり; m o b R P 4 は、プラスミドを1 つの株から別の株に転移させるための可動化エレメントである。b l a は、カルペニシリンおよびアンビシリン等のb ーラクタム抗生物質に対する感受性を賦与する β ラクタマーゼである。S a c B は、スクロースに対する感受性を賦与する場合である。

10 p C V D 4 4 2 — T e t — B R P — A B ベクター、2) サルモネラY S 5 0 1 0 2 における D m s b B 穿 色体 D ビーによる 相同的組 検え、3) サルモネラY S 5 0 1 0 2 への乗 を 体組 ため、これに後く 検 V N P 2 0 0 0 9 へのファージ形 3 3 3 3 3 4 4 1 . 2 . 9 — T e t — B R P — A B を もたらすスクロース分離を示す 国である。 O r i R 6 K は ブラスミ F 複製 担点 であり、m o b R P 4 は、プラスミ F を 1 つの 棒から 別の 体に 転移 ざせる ための 可動化 エレメントである。 a 血 p は、カルペニシリン およびアンビンリン等 の b — ラクタ タム 近生物質に対する 感受性を 熨与する β ラクタマーゼである。 s a c B は スクロース に対する 感受性を 関与する ほんどった に た に た と た 性 意

[図34]

SROV3 細胞 (平均数= 8) に 7 2 時間暴露した後の、陽性および陰性対照 (HSC 1 0および4 1. 2. 9) と比較したtetBRPABクローン# 2 6およびクローン# 3 1の細胞海性終を示す図である。ペロ考索の発現は、テトラサイクリンにより誘導した (クローン 2 6および 3 1 を参照)。 テトラサイクリン治療あり (+) ;およびテトラサイクリン治療なし (一)。大腸菌株HSC 1 0 は、細胞毒性%の陽性対照として使用した。 「図 3 5 1

テトラサイクリンの不在下 (1A) およびテトラサイクリンの存在下 (1B) で、弱素化 臓器標的サルモネラの、血液果天上でのハロー形成を示す。また、テトラサイクリンの不 在下 (2A) およびテトラサイクリンの存在下 (2B) で、構成的にSheA、を発現す 40 るよう操作された弱帯化腫瘍標的サルモネラについてのハロー形成を示す。さらに、テト ラサイクリンの不在下 (3A) およびテトラサイクリンの存在下 (3B) で、テトラサイ クリン誘導性SheA、を発現するよう操作された弱悪化腫瘍線的サルモネラについての ハロー形成を示す。

[図36]

(A) へキサヒスタジンタグを含まないTATーマポブチン融合タンパク質を示す。(B) ヘキサヒスタジンタグを含むTAT一アポブチン融合タンパク質を示す。(C) 〇MpA_8Lシグナル配列を含むTATーマポブチン融合タンパク質を示す。

TATーアポプチン融合タンパク質のコード配列を示す図である。DNA (配列番号5.7 50

) およびタンパク質 (配列番号58) の両配列を示す。

[図38]

へキサヒスチジン-TAT-アポプチン融合タンパク質のコード配列を示す図である。DNA (配列番号59) およびタンパク質 (配列番号60) の両配列を示す。

[図39]

C57BL/6マウスにおけるM27肺癌増殖に対するVNP20009/サイトキサン組合せ治療の効力を示す図である。

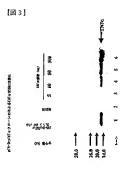
C 5 7 B L / 6 マウスにおけるM 2 7 跡癌増殖に対する V N P 2 0 0 0 9 / マイトマイシン組合せ治療の効力を示す図である。 [関4 1]

123411

C57BL/6マウスにおけるM27肺癌増殖に対するVNP20009/シスプラチン組合せ治療の効力を示す図である。

FIGURE 19 CONTROL TO CONTROL TO THE SET OF A PAGE CONTROL TO THE SET OF A





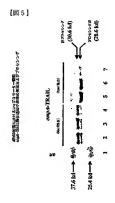
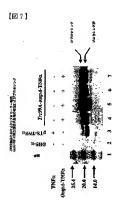
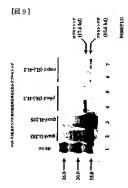
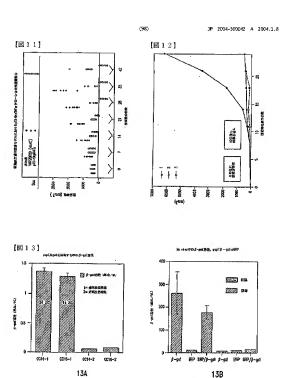


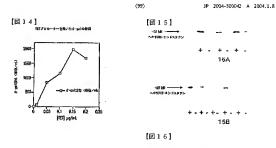
Fig. 9.1 In the weeks that the winds of the first of the



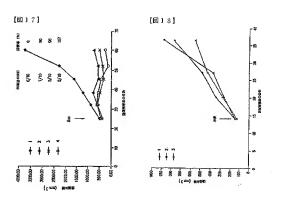
TEM 50 THE AREA CONTROL THE CONTROL THE GOOD THE CONTROL THE CONTR

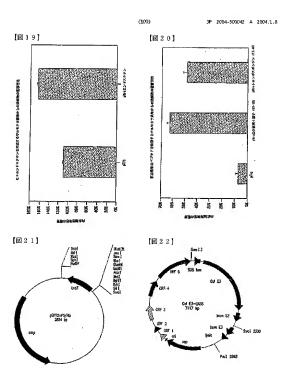


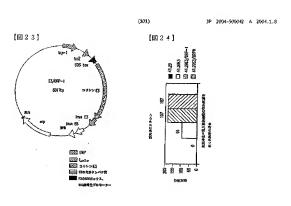


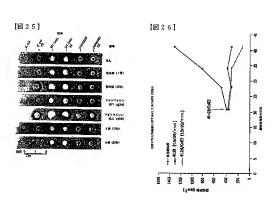


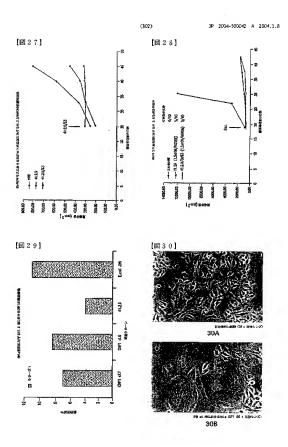
ヘキザボリーエンドスタサン









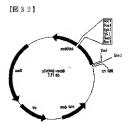


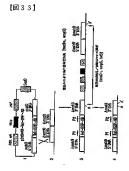
(103)

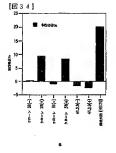
JP 2004-500042 A 2004.1.8

[\$\overline{\text{M}}\$ 3 1]

Uniform Sections of Proceed Conference and Conferenc







[図35]

[図37]

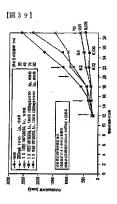
496-4 Fの発金 : 5社 to: 4かも32年 7月刊 7から49度で (全額34) 84的

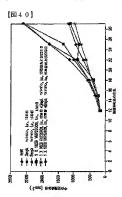
The second of th

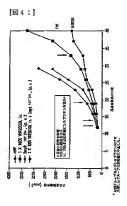
[図38]

tetics and merceletters from and make - 75 has believe a tet

The state of the s







【国際公開パンフレット】



(107)

IP 2004-500042 A 2004-1-8

- Without comparised securing or endode

SOD BUSINE

COMPOSECTIONS AND METHORS FOR TUMOR-TARGETED DELIVERY OF EFFECTOR MOLECULES.

This supercules allows principles TLS, provisional paramit explications than, good 1775, 500, 607157,591, and 60437,697, filed on Orankov a, 1599, the contents of each of which is incorporated totals by science the estimate.

1. HES DOFTHE BYSKINGS

The process investion solution solution can find our of through principal efficient process investion solution solution for solution of the nation. Note particularly, the investigate is related to a solution of the process of the solution of the nation. Note particularly, the investigate is related to proportion and use of internated topoccurrents is noticed. made as, e.g., follow-rollic as a reason for the delivery of one or more primary efficience statiscation) to an appropriate size of schem, e.g., the size of a solid scenae. Recollically, the attenuested torser viragested backtein of the transpillen is a flavolative service or facultative abstraction convergence describes of the formation in a basestorm a protoco or abstraction abstraction which is concluided to each one or converge internal reduced reducingly. The pointing officers an electricity of the invention includes accounters of the TFMF spokers faculty and in equipment formation, and other invention includes an experience. The primary officers molecules of the invention are warfely, for compuly, to force a policy include causer and may a careineers, melecome, igniphers, species, or metaptions derived from these turners. The Directions further others to the supprising disputory that prints of control supprising disputory and prints of control supprising disputory and prints of control supprising disputor and prints of prints of control supprising our product can be delivered in only to be such as prints of control supprised disputors with reference can be delivered in only to be such as a supprised of control supprised in the control of the co tradicity and codecod second-colorains complications to stor toos. The investmentable selection the delivery of one or process optional effector molecularity (named "becoming effector The definites of these craces agreeable secretar interacting processor measures processor and the professor processor and the processor processor and the processor processor processor and the processor proces policiany official explosible(s) at the appropriates the of waters, e.g., 41 the cite of a solid

2. BACKGROUND OF THE INTENTION

A cooplass, or brigo, is a possible to extention from abnormal end growth, which can be being or as ligram. Besign humanges or life or casin brediest. Meligeon number (potentily have the polestial to breads and dettery mightoning leady some and 33 emissi specimily have the postero as mount brackmany angular and august, 1976, desire special to distinct their side once descripting review, set Bobins and August, 1976, desire

KONTRAN

PCTACERGRADAR

Alleddings, 24 Cel., 18 K. B. Baucher Co., 19-Biologhia, 19, 191–123. A surface to said on how processing the latest in long-series than on support entires to a make to. Auriler problem is the characteristic period of the contract transport of the cont

as all states one remaining synthetic to device when a loss, revenue, in tarty in resources, the distance formed time design of lebesgatus delivery systems, such an employies, cyrobiacs, and virtual for recipited delivery of drops, pre-drop conventing entry and, aution games less femor cylin (son, e.g., Crystal, R.O., 1995, Senson 276 objects).

II. CHILLEAR DESIGNATIVAND CYTOKENES

The Contraring first the restricted abead leaders activating as profusing a stickle immorrary common contract and contract

32. YOMOR NECROSIS PACTOR (COS) EAMSLY OF COTOMINES

The best distances of mode of a No TV Marky 1 to TV M. 1 The of the security and the security of the production of the security of the production of the security of the secur

٠2

WORLSHOP

PCTHOEOUT3244

1982, Ann. Rov. Mazamol. 10,411-433). However, so a reach of deat properties, specially admirate and TRUA. However, he had compressed in the food data to discuss leavest between the compressed and the compression.

Other symbilizes have also been implicated in path-mater expresses. If 2 [in client in cytokins and is retorifying it to play in role in smil-terior imposure. For example, approximately repressing militarious plane been approximate with all restored international.

sportantially regestaling selections have been especiated with circuit of interventional feed of TNP-c att FL-2. See, e.g., South or and Control, 1989, Janes Rev Soussent, PGS-453; South et al., 1987, Lance Rev Soussent, PGS-453; South et al., 1987, Lance Rever South et al., 1987, Lance Rever South et al., 1987, Lance Rever South et al., 1987, Lance Lance Lance Rever Lance and Lance Lance Rever Lance and Lance Lance Reversible et al., 1987, Lance Lance Reversible et al., 1987, Lance Lance Reversible et al., 1987, Lance Lance Lance Reversible et al., 1987, Lance Lance Rever

The TOP-4 and IL-2 rid is Speciesys bening and IL-2 has been flower to be fined to make the property of the pr

In Secret 1-99/LPT; and Wistander et al., 1997, Am. A. Battol. 1991-1990-190. In the processor of birth Total-ca and II-2, the optioption standing of this sect a LASE cells to Increased, Mean white distinct against TOM-instructions of all Respirators, and Communion of A. Different and A. Dif

The County for the County of t

13. DELIVERY OF CYTOCHUS

Receive experimental administration for the pre-received to Sympas systemic trushing of expeditives and officialized plant downs, formula the Apparent to Sympas systemic trushing of expeditives and officialized of cytologism. In merica months, successed 200 assess that we be an avoid with administration of a funguously ground recognition of 100 %, and a simple systemic content of 100 %, and a systemic con

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N... 9/17/2007

Whiteday

PCCARRENTENT

TO CHARLESTER

TO CHAR

As circula margin, comparin paner analization has boas adversed his-migraphic with TSP and shirthers to read team and model heir registants. Incomments are in jumps of the TSP and shirthers to read the registants. Incomment, the noticing represent anter or thing is to print the properties are ready and the properties are ready and the properties are ready and the comparing properties for the printing storement. Predict to the properties are stage to the printing storement and the printing storement and

30 Contraction of the Contrac

15 200037-0008 have respected the explicit discussed of physical relation to ordinary LL-III (Chemical) and The Solizational (Health Solizational) (Hea

A. Additional objection of the process of the proce

DOD BETTER

providence of an equilibrium but ocurs call proliferation and cell death, the latter resolving from the Dyposic measure of the previous for towar (Follows), 1985, No. Mat. 1:27-31). The resists from the presenced to be seenthe status regions a which in the behave of the regulatory fractors of angulapses in forms a sent balance for outuge people's factors to one in which the presence factors and a filmobiast growth force (FCP) was resoulte could also warm any process (access, such as Bestolates growth theory (CCC) and resoulate calculates provide Search (CCC) of a conduction (CCC). 1998, Name Seat. States 11 (60, 51-61-17), The solid his fathered between negationy from it is a result of the seg-regulative of the requirement between sent the shared-increase above-completion of anti-stoplegatic factors (Gallerian, SS), N. Reg. 8, Med. 33:11727-1733).

- 28. ANTI-ANTI-OGRNIC FACTORS Authorgiogenia Bostos were probabiled so make no she backs of personal related phenoment that had no the creativation that pressury turnous often inhibited the growth of their petrostrot (Care, 1998, Proc. Add. Subsett. Biol. 20-161-1793. The first of them theters to be included true record suggestable, a NG \$120 protectly to dispersor of planeter
- Rate: at septiment produced in the distribution of decisions. France and transmission of decisions of the second the growth of cocondary motoriores (O'Reidy et al., 1590, Cell 70:515-328) In language, populates of 49, 42 and 45 bills produced by the family protective a plase managem with pressionfeature favor met-organization and/why companied to according to indicate favor met-organization and/why companied to according to indicate for the control of the
- totace or its (Dong et al., 1997, Call \$2.50). So conside tomars, anglessadar production is catalyzed to strine processes excharation manufacturers, where terino protocors are
- product directly by the rance self-(Confe) or of, 1997, Center Res. Solidit-1-1990.
 Administration of capitatish as a concentration of (Obaquity by the mornismum) pulse
 with principy increase resided in a surgal inhibition of capital points without entire side. effects. The sympte regrow within 2 weeks of occasion of the tegicitates breaten indicating that the turnous regrets error and comment and under this trajectation breakness, of the trestment (O'Rodby et al., 1996, Nat. Mark 2508-682).
- After the discovery of acpletation, other analyspens to table in, including control to proper to the control of augeogrees shan segmenters is hetergie S_s a proteide comprising sie fifth laingle demain of phirmhrogen (angioutides comprises bringle demains 1-4). Kufugle 5 cm be produced by No pretrained of plantainages, and except forms on the color (Co. et al., 1997, J. Bod. Chem. 272/2984 (21928).

-5-

September

atal., (997, Cell Skel (20), the course being a menior incomprised inclines other there a Lowis long outcinests. The popular line are apprepriately decider costs of 20 (20 whose sace corresponds to the C-terminal of cultages XVIII (O'Reilly et al., 1997, Coll 18: 1-

- 20), a region collect NCI that is divergent among service colleges accounts (Ob at al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. LISA 91:1229-4229; and Robu et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 x234-4238). In mice, the provide of Lowis lung encourage manufaceds
- expressed by the administration 0.3 mg/tg/day of reconstitutes automate, and the prin have regrescs to a decreest mess when the payade is a Code Brand at 20 ang/cytism Passioni recombined endormin can be produced from factoring butter, office in step by inception and conjugation of the meta ph. typ constricted toposite of interconnected
- safriktisted endertsein heliuwaa bady proptasionus (O'Reilly et al., 1997, Cell 22.) An illumeina nankad of carbonala delivery concluing of inhammanian mini cintrales of us, madestatio expression plus soid stands in early the pential kultilation of humbr grounds in a crosses model system (Blackspar et al., 1995, Mar. Riosech. 17:348-345). Similarly, 16 exhaustin or negicatasis-corp ling places of complant to depote the war delivered jurish some that was delivered jurish to the property of the case security of the property of the case security of the property of the case of the property of the propert
- brout occors (Chen et al., 1999, Causer Res. 59:1303-3;12).
- Because, a sover and another sension with the best stableted to a Communal transmission pupility of the Scienti (Sarina Persona tradition of an informatical (O'Reilly et al., 1998, Sciente 285:1926-1927). Full length and discording to the best set of selections and the conference of the sension of the sen paintly, but upto charange of the Cazzalland mandra loop of the protein by fluoratio, unti-theoratio requires potent maginguate antivity. The protestyrio fluorest is referred to furneation as stall-employeeds noticitarealists. Other angingsmusic-led-fulfung cognition leasers in the ser include the 25 kills.
- N-construction and an 40 EVEC Columnical production for Structures (formation of a columnical formation) of Structures (formation) or all 1985, 3, Aux. Parisol. 120:122-132), the 16 life protective trageness of postures (Crape) er et., 1990, Restoccionings, 130:1792-12999, and the 7-3 kDe prejudyfu fragment of placeful because (Oupes or al., 1995, Pres., Need, Acad. Sci. USA 92/199-7803). his addition to those remarkly produced protectives fingueses that have
- demonstrated anti-engingenic effects, governit greaterity populate that correspond to regions of known extracoliphs matrix problem have been assessed for service in whiching engingacesis. Symbotic popilidas artica figne bene de securesad so ha ricariposi eu fotoritat infabitora, i.e. angergarosis inhibisosa incisen e 13 anseo unel pessitis ourcepending to a thansone of plante: thouse-4 (thinks or al., 1994, Choose Res. 5): 2077-15 2003); a 14 amino acid popole corresponding to a fragment of codings 1 (Folice et al.,
- 1993, 3. Coll 9/ot. 122:497-511% a 19 nation and page do proving rating to a flagrana. or Three-interpreted at (Tokens et al., 1995, J. Coll Bibl. 172;497-51 fc; and a 20 amino axid

Windson day

PCVADSOUGHT

projekt contropolitar in Higuano editAndo (Fine et al., 1965,). Cell Hinches (5712)—1354), a secured cruthery delta et alemandate retain geoprophin internet aspectation in human metaterne enth between the ordered collabor invasion in the secured control and analysis of the collaboration of the secured projekts of time the most included projekts of time the most included (Laddon et al., 1656, Nation 1660, 1747-1745). Chair repulsion of time the first collaboration delta della delta delta della delta della della

- Chair projubbs of leas then (9 accine scale that in thicket rejetions and on execution to freguents of technical, filteractics, poor, others, and 200 fear allow beam described jean dessivered by Coo, 1978, Prog. 2013 better. 200 (40 - 176). The stantill fleetons using perfect size in the control of the
- transportion and bild riding to livingthe moderantes. The respection of paging the gibt, searched to solve augmentation between the processing of the gibt and the searched to solve augmentation of the gibt and the shade of this partiesty by mean closured with the least accordance and the shade of the search paging that the conformation of the search paging that the search paging the search of the search paging the search p
- 35 unphiguesta eribitar of lanogéra bésoltera medi za eredit pemagapatikas and encontinual anchicale has from storms as pemonte mapur organizars hal institución flot capações e el anchicale de from storms as pemonte mapur organizars hal institución flot capações e el majorquició bildor etrache (lanoma ent., 1997), e el 1915-137-1369. Presidente conspisios, the NGO modifi, and secultar lanoma tractique prodit. NGO (methos estable Are-ON-Areg), altresand trapações), elektrace dissolvente society.
- The inhibition of the studying distance type of old section proper, using the original property of the section of the control property of the co
- *** USA RC-1021-5025). Such assegn sints have been kinntifued by hosterisophage peptids display of meterm peptids; (Ornehma et al., Proc Yeaf, Acod. Sci. USA 917120-78107). Ornehman acqueres fluors of the compter's ligand, 87-5, turns also been simulated @disc et al., 1976, Concert Ros. 50. 2022-2013).
- This is a descript of regiments, evaluates and solar engineering registrer involved party of registrer involved in the surface in the party of registrer in the involved party of registrer involved in the involved party of registrer involved in the involved party of the registrer involved in the surface in the involved party of the registrer involved in the registrer in the registrer
- 35 Chapsed Ing. on that popularly man the description of the tension of a bird has to be seen that the tension of the tension in to oldy in respection). But thought that the tension robin mention that force pupilishes have to be a fedurated in cook large questions that then, 2007, a real-oldy are

ringraded in the inlocal attenue and, encount, of the embostics that sie warrier dependence orby a very limited projection main their way to the sense. This, is would be a great advantage to the first of sumer decays if contranging our protrine or peptide, could be delivered more efficiently to the tempt and in a space occupillation in and owner-friendly

2'4. DACTORIGON PANILY

College C3 (policyed to berefuelter to CollEG) is a bastophology, i.e. a importal group interests on College in the college in the college in the first in interests to the look in. Basteriscies may be exceeded by the host gampus or by a plantic, may have a broad or namon stage of hours, and may have a simple control court ching out or two inhands or

- may be a main debuse structure (Kooliky, 1962, Ann. Rav. Milrothol. 36 125-140). [p addition, a barenicain hard has an immuning against the basteriotis. The immunity is Stand in the case of a given hast paperaries, even there that do not express the between our The coverainty of Colliss remain from the bibliotics of process, guestosis (Naugres,
- 1963, Cold Spring History Symp. Quant. Bird., 28:155-5343. 'The sarger of Coldit authors is the MS component of Control of Co (Bowmen et al., 1971, Proc. Netl. Acad. Stil. USA, 68:964-468), and the strivity results in the degradation of the ribosoms (friendsels, 1970, Dags Nat. Acad. Sci. USA). Col63 nearing as unique among Distrace, hasher to done not count the normal degradation of RIAA, overs mKANA matheculus 45 unstantidus florandus end, versitões in the sypersonan of the ATMA from the extRAN and through intuitions termination. The absorptions exceeding of Collid residue in the medicals intell, under from being readinted by arother protein
- (Branduc, 1976, Netter 274.115-)16). CART to 250 this in practice the inner and outer accepted as of the target cell.
- 25 In its name by occurring from College of a 60kDa province complex concluding of a 30kDa and a 10kDa provincia is a 310 mile, the larger uplant basing for exclusive activity. and the smeller release Loving his descrip fraction of the MicDa estudie. Thes, the SUGDs protein acts and dynastics; protein for testing, and the Militage policie are as an accuration The 50 MDs subscrit comprises at least two functional demains, an Hospaical region required the translocation acress surger outlinementation, and a C-terrorised region with
- catalysic (IOM-ser) noticity. Within the heat organizar, the strictly of the large released in inhibited by the stretch submet. The submits meshought to dissociate approach yellow to aim her other targets cold gat a retrait of interpretions with the rappet call is cover occurrience (reviewed by Kontinty, 1960, Ann. Rev. Milesenes), 36(12)-144)
- The tradity of the large patient of Cours has been of seed to present the laters. quant of closed grass surreguriemorganisms. Theret at (1992, 84s), Indicated, \$5:855 gen skrytyt (citet (mm) Dana od neh dana CBIAT) to stenorogeneo (mm) sout balangapa (-866

extraction representative

expensed so a chromoscountly (proposed softing sequence and the large arbitrat was sourd from a platenist. Burtoph with the change property image and sould relieve to platenish view supreme the Celiff large indicate, but if the platenist were no be ewed to another codesiant than Jacked the enabl subsists, share of sworld be

Colicis B3 (Colii3) has the been shown to larve a professody systemic effect or ya novellat cells (see Seconda et al., 1978, Folia Microbat, 23.272-1711, lockylinn a Joulannia cell methd nyamu (see Fisha et el., 1979, Especimencia 36:405-407). Collid Milisky amperation 406 volunt of the 885 excennicies riboccome (Dampouchy et el., 1973. Blooders, Siocows, Res. Course, \$2:327-334h.

2.5. BACTERIAL INFECTIONS AND CANCER

Saidy efficient observations repeated manuals which contain causess were reported to regress in patients with terracial infections, New Klaus et al., 1903, Acts McGCs. Scandbarder 146:1-102, (Suppl. 276); and Shrus, 1990, J.A.Ar.A., 142,383-190, Since these observations, flow et al., 1992, Prop. Half. Acad. Sci. USA 59:1047-1851 (Los et al.)

- and Joses et al. 1992, Refort Tensius. 60:2473-2496 (Sonot at al.) Solvent mediate of Substantia (phistorian that percepts so souls HSp2 (business) in the secundar) ealth in televour algorithmently ground absolute than the halts type around. The "bypartimenter" read auto were builted mader possiblens of a grobin power of the burterin
- the necessity repress the stricty of wide-type maters to brands MEp-2 cained online. However, with hyperinecolous Spheroschia Spherophers to distributed by two or of such it or of easy the tiels of pure interpret to be have a could fined to wide-spread bacterial. infection in the contex regions.
- Convolver of al., 1973, Proc. Hot. Acad. Sts. USA 72:1666-3609, dynamous most than 26 price injected with becallur Coloranis (BOD) have increased strum invok of TNF and that TNF-positive strum cased coursin of the corona. With A and other maniphores tuners in mice. As a routh of sect charmetens, a were estima of excerpotents with DCO fejections is compartly stifficed to sense cannot discapp protocook. See Rossownici, 1994, Consus. Then, 24:495-701; Black and Markon, 1995, Consus. Then, 24:495-701; Black and Markon, 1995, Consus. Then, 24:495-701; Black and Markon, 1995, Consus.
- 30 Pritting, 1993, Meet. Cross. Tower. Philosophics 10.38-36 (or reviews of POS abstracts. However, THP-e-recoketed reptio shock is erroug the petrony coroner amount of with because, and one have impo or inited examples case (to the heat (town, 1992, \$2.14). 256:1452-7455; Discreto eso!, 1993, \$434A 269:1870-1835). Furties, dans lapinag. systemic instactly of TNF-s has been discussed terrait to effective classical use.
- bledifications which endows this form of an incremy response worth he week to TNP-2 levels would not be tone, and a men affective consentration and/or depotes of the thereposed vector could be made

SWI BITTER

.....

2.9. HINGE TARGETER BACHERIA

Converticity organized Subministrative have been descriptioned to be organized frames largering. powers mini-tensor at distinguishing was world in delivering a filterior gazen such as the historia semples dynamics binner (BBS *125) so colid nunces. (Therefore in eff., WO 9699218).

25. DECREASED INDUCTION OF THE ACTION OF THE

Hell Timbel are to the fight on appeal to the flow-conjust in terms which for the second seco

Big Martinelle south 'Bay south and beginning to be 1994, See Brook 1994 and Partinella south 'Bay Martinella south' 'Bay Mart

für ib den (Örre, 1902, JAMA 269,3432-3455, and Diamerko er af , 1993, JAMA 268,912-18 RISS). In addition to these Subsets, selections to problemleis can reversely completed coping with the terrorison of beaution that the three subsets (Challage, 1996, D. T. W. Diach Tilenzell Wachenach's 1996 10) 275-7; Routes et al., 1996, Earbern Eules.

Tripocolini, Clim. 14: 540-51)

These and Provide, W093119817 ("Hore and Provide"), displace eached, to produce province further burious provinces field A or 1.9.9.

procuracyatine function function opprogrammes Light A or LPS.

56 bitschott, WORASSERS, describing a representative of Conference to investige a registration to the world game which indicate TNRs at a lower force or compensed to a while type strate.

. 10

ndos et al., Y/O 9W13USS, touch compressiones and discription of the mobil general Educatella, which require in Educatio parametric of linear stillay to chois TNF a and referent whatevas expressed to the wild type. In contain tentedurents, come ruth respect Subscriptic keys increased probbing to chebring a as compared to wild type Schworelle. Son also, Low et al., 1599, Netter Biomed, 37.37.

Citation or identification of any references decision 2, or say rection of this application that is continued at an established that with reference in great lable as gries corrector movem in worken

2. SUMMARY OF THE INVENTION

The princip learning provides methods for deflecting our or times princip affected under allocated to a solid terror. In an embodourum, the methods provide for dictions of a high I teel of one or more printing efficient application, in particular, the investors provides weekeels by which a priceary effector multiculates, which may be inside at indicat newscand effects (e.g., servered immerstaginal affects) when delivered systemically to a book ear be delivered locally to name by an americand open arrangered bacteria, such as Solvered with reduced evoluting so the loyer. The present incorplice cocompanies the preparation and the two of advantated incorrespond functed a, such as, e.g., .Salamontic, as a vector for the delivery of ease or more paintary officials; metacology) and optionally, one or more secondary of footer and exactly Lo. on appropriate site of action, e.g., the site of a point numer. Specifically, the attenuested tomor-temporal becoming of the investion are facultative

services of the state of the st efficient maleculate) and optionally, one or more montaliny although a plantation. The process for radios provides aspessened ears to strategy of bostonia explanered 25 super st markets and production considing primary official moderates at the size of a saled

- turns. In a specific embodiment, appropried terrain surgeted because use engine expense a cumble; and projecula coording a primary effector posterate. In sortion cashodiseast, assessed transversional banesia are engineered to express can or succe antiels sold nationales excepting one or more primary offerter endoutes. In secondance 30 with this embodiment, a cloude batterial strate is enganessed as express one or more auclin acid stateonics counding east or more primary effect; represents or the size of a solid
- Names. To excellent embedificately some their one assessment himsen largested backeried stools in engineered to express one or some medicin upid medicales executive past or more pricestly official and lowles. To a mode of this controllerant, the extrement tener-largered becomes 35 anaper one of the restre thereins presented and all the manufacture of the material across
- targetted basection stations are of different appealant (e.g., Linearie and Science (e.).

2/0 (1/21)

PCYAESGE13241

The principle different magnitudes of the nave good part of the properties of a model hereof review with the confidence and form projections, or sections. As proof form, "reserved on a "coll learner" or "finest model for more "reserved part of his learner of the collections, and the collections of the collec

- Finally in the tabilities of grands of a tensor or invariable. As bitting of some rails, or the provention of the injured of ment cells to other peets of the body. Accordingly, the privacy (Shocke tradecold is provide a disreptions office) for transaction of a hours.

 The privacy official radionalise seak to derive fines and journal operation.
- (et private) enter interest automate de l'execute, frença, automate, a vivous, le se passivera ancie et l'exte et problement et les inventes, de prisany et l'externa pois et l'exte et problèment et les inventes, de prisany etitere noticerte et la derived fine a sensantal, il se urang restront entre et diven bouldeure, Preprintry etitere policologie in richel fine a lesson. The prisany etitera mointoine et die invesse in totale mombou o efe de Triperily, suvenigation favour, erroreur et revoite in totale mombou o efe de Triperily, suvenigation favour, erroreur
- efficient exclusively in normal from a largest. The planny efficient infollows of the invested include monitors of the 7th entire, phonoses grapher from, phonoses projection or psychiats, neutral infollows entered, in described fragment street. But project two substitutes and street of the TeVE finally or forcement of figure the two streets. Exception of 1th TeVE finally or forcement fragment the month. Exception of 1th TeVE finally or forcement fragment the month. Exception of 1th TeVE finally or forcement fragment the month. Exception of 1th Entire finally included fragments the month. Exception of 1th Entire finally included fragments for finally finally
- TOWARL, CD40 Speci (CD401). Ever (peoplessees siphs), ETG (peoplessees to both, OXXII, (CXXII Special), Fed., CD401 (CD37) Hannie, CD504 (CXXII Special), 44 IBB., AFBL (e) profession Grani-durine (spinsk), EAGHT (n. 29 ED4 type: It is unusualizates profession, profession, TW6014, in the content throat-discoverable profession, and the content throat-
- 30 In wording specifies exhibitions, the painting sillness reductive within lements as some any important states or Positional Registerion Detects." Extension of confessionation for Positional Registerion Detects, Indian for, and Indianamo, supplication, specificiary, not-implication antiferomistic (II), the 20 PDS IN 1-centional and 40 PDS IN 1-detection proceedings in Registerion Section (II). The Positional Registerion for the Position Indianamon Position (II) in Position Indianamon I
- 32 Noncomment of Arthogony management, the install protection of capital and protection of the protection of phoneses of ph

- t2-

SOUTH OF

CDCBMinate

and ografic 22 author and popular stragment of Secundoropoular 1, via and confusions 27 author of Joyath Secundor 47 (NOS), containing profess, the result anticle of Joyath Secundor 47 (NOS), containing profess, the result anticleption of Joyath Secundor 17 authorities and profess of Joyath Secundor 17 authorities 47 (NOS) and the VEOF secundor 18 authorities 47 (NOS) and 18 authorities

satisguoines of European of B, and the VEOF inversion. The previous destinations of this term sizes, a principal relater variables with interactivities in Separational Registers of calculation, planting man or internating profile. It is a value specific selectivities of Registeries y European profiles and previous epitations polypopiation or profiles, or flowing and European European European European appropriate or profiles a voice in provides and in the profiles and a polypopiation or profiles and polypopiation or profiles and polypopiation or profiles and in the profiles and the profile

- popygapose or opposes sociolo, qui un mismo a, internació a co provincera maisverselvais, speciale de servez base i (CAPT), epitemic executo filmer 2 (CAPT),
 Passeprella multicela arc poresi (PAT), Promitimoser exectoria, transpira cartosia, CAPAX
 transpepidas mismo arc poresi compagnitor (Intiliana of Stanegiera naciona, especiale). In intranspepidas mismo anticieno, CLC librare seleberan, compress, pril print, surio print, surio print, surio compagnitor in territoria.
- Friellichere, Petr Lieuze stadenbere, CLC Hinner stellbeiter, engenze, pril park satry (dit.). En professio des soulchunes the primary effects stadentes an extractive of the between long-stadent des provides (principal parkets). The provides (EEPs, yellow) for provides (EEPs, yellow) for provides (EEPs, yellow) for EEPs, provides (EEPs, yellow), EEPs, provides (EEPs, yellow), Complete, Comp
- Colleins A. Collein K., Collein E., Collein B., chanta DFIT, postein Al 172, stephytocolein.

 1500, hujvrici FIZ2, precin R. or APIL, nespecia A-256, sad vibulccia. In a specific embeddenest, the privacy of South moderate is architect and the second of the second of the investion of the second of the investion of the investigation of the
- 30 In monitor specific curbodeness, the pressay offense analysades of the invention are stated with the year, we can be found in figure as the control of the invention of stated with the pressure of the control of
- The princes is worther fire genders makes to the test, morthworther delicities of the trust of t
- 30 anchée embofisium, secretared senou-tergend lautheir aux originatori de represe ess ai verse custain avid anticate accollegamen en man plante referent redirentes and ous er trace participat portione productive. L'accide bendiren senda des la lacticitat senda l
- 35 getad tonce. In unether early durant, some tings give at most call terror-beginnt instantial person processing on an example early as successing on the standard sold mark rather extending one or processing principly effective authorists; and one or respect protesting effective and respect to the side of a

-13-

collid turnors. In a regardy of this controllerance, the extracted turnor surgered between the are of the same species. In stacker made of this embaddment, the extense of territotageted books is track, are of officers; spaces (e.g., Listene and Schwerolia). The secondary officers as books of the investing provide objects that two

theregonic notivity, entrance relicent of the primary effector moleculety from the security flower interests to the security flower interests the classical formation at the site of section, e.g. at the pin of a colid nature. The promising effector projects left) of the introduction correction is makenulo (such as no unil-terms promise, épokating that not be not to a optobories, and

eurypes shid a becomispict a pro-ding convening entypes; no assistant controlled a photogram; in autigest ext) which is delivered in collision to the galaxyr effector a ex desir research to the a fresh of softward of the financial of the state of the салтілесце, кто'євома, (уклубома, ог сугроде.

The storeship efficier molecules one to derived from any known organism, including, between Kunited on, migrate, pitches, baccasta, fingel, and provises, or otherses. In communication from the reconstruction and the state of the street of the state of the street of the derived from a business (e.g. MAP). The siles professed embedienates of the invention, the

secondary offseter motivate(s) is desired from a vicen (e.g., TAY), to yet other predicted emba timum of the Invention, the secondary effector real-cube(c) is theired from a smearch. In continguation of emballings, the providing effects real-cube(c) is derived

20 Dua e limite.

The instantion provides attenuable some imposed factoria comprising effector suplectate(s) which are recorded by a physicially transfer with such in ord. In a professor exchangement of the Invention the effortated incorrected hosteris it Sain north. When scure than non-effector maincule (e.g., primary or secondary) is experient in an attenuated. Europe-largeted basteria, each as Salmonalia, the effector motoralist may be encoded by the same pleasand or models acid, or by more than one pleasaid or problem suit. The investiga nico providu, estresotes sumo: tegestri bustris comptent affican moleculo(s) which an complete by a markets soul refacts in an agented into the busterful garance. Integrated, afficery analogula(s) way be anappeared to assummented some designed becario, such to

30 Salmacellu, or may be introduced installed estimated former-language between (e.g., by junctioning of a maker sold which consides the offictor molecule, such as a plantic. (mostoctable models sold, transposes, etc.) such that the stately unid exceeding the effe miniothic becomes integrated for the genous of the attracted manaceteristics became. The investion provides a succitio said containts enterling an efficient endecate which

3.6 pactale axid in operately hadred to an appropriate growager. A grounder operately firsted so a such is said outcoming an efficient numberule stage to be translogues (i.e., rating) or heterologica (i.e., axi mating to the audicing said expeding the efficient materials).

ADIRECTAL

Exemples of sciencial grammors include but use und Berütsche the Top promoter, the, 1947-I.

The, with, poil is (disch), that, sectio, useds, useds, useds, useds), decay, our, our, our, our, notify und page.

The present invasional data procurate matches for lack of dath ray of ext or or with factor protein recognitive a signed regionary and well activities that in proceedings assessment of sometimes and understand recognitive statements as expected as expected as expected as the controlled recognitive statements are expected as expe

- (director conducate). Without inventing to the finished as a metabolism, the passed invention between the life of Ging-Tiler provide came state section and the first three charges of the control control
- 5 pocipium, Incortain comprenent clauses, the fraction of the efficient institute to an Otoplike present is used to enhance release of the efficient materials. Examples of Cong-Dale gradual sized, his or used trained on a few any protocol of case of the following: Open, Ones, Ones,
- (CALL), 19(0), 19(0), 19(0), 19(0), 19(0), 10(0), 1
- The precent investige a lawy populate quarticals for local delivery of each or more basics provide comprehens a lawy populate and an eliterate market in the solid terms by entrypoid tensor any poted backers. Furth prepriets that is linear provides for a basic
- Actions in decilitare the substrayed in exhiption of the register of printers to without \$p\$ and \$p\$ and \$p\$ of the register o
- 35 cells: in a specific controllarum, assessabed trenco-registed factoria age engineered to expense a supplied sold sold sold tool based consulting a finite protein prompting a first you gitted and an efficient protein companing a first you gitted and an efficient polybody. In manifest controllarum, assessated terrors—cognised because are

- 15-

SOUND ON

CAGSMITTER

engineered to express over or easier washin and aupteroists encoding one or water fielded growing engricing a derry growing seed as soften, when was had a coverciouse with those sociolatescen, for softened protection lengths agreement process and considerable of these readfinancians of forey population installat, he are one first only a greated activated from the 100° ATM of profits, the assessment in figure and the confidence of the co

- (PCI) merokum-cranienalig respector (AFTR), and impris amplito virus VP22.
 The procest investigate along private analysis for love distinct vP22 of the process of the proc
- coupling out or mean feature proteins completing a tight engineer, a featy proteins and on other or molecule. In accordance with this embodiment, the effective residence prop to a grantery or score days effective medicade.
- The primare revention has provident resoluted for Notal delivery of the or manus. Must be provided compressing a signal properfie, as provided to conseque this is first properfied and attention to remain for until horsest the polarisation demonstrating and primaries. As a specific exclusion, stronged transcring and lossessing and primaries are suppressed or manuscring and properties are suppressed to the properties of the suppressed or manuscring and properties are suppressed to the suppressed or suppressed to the suppressed of the suppressed or suppressed to the suppressed of the suppressed or suppressed to the suppressed of the suppressed or suppre
- The certain embodewants, a shagis baset rule strain is emplamental or assense comer prove metale and majorates acassing a familiar protocol of the convention of the state of neoledense;. La certain does exhabit questions, owns dipute my amenanted harmer desperted the state of seems to regimened the apparent one or smoot purship and prodermites monothing conser protosystem protocols from lawrendom and their law of majorates. In monday of these
- 23 emboliment, the assessed but on-august of beautiful control and of the control species. In parties modes of these embodiem sits, the assessed transportangement becomes are of different species (e.g., 244 time and Sobran Will).
- The present investions also previous restlicts for based delivery of sites or more flowers present with a few terms and more translations and leading of the investion in the site of 1 paid from the premised in terms of the control of the investion of the sites previously in the interest previously and extensive previously and the previously of the prev
- The propersi investion also provides expression of a primary effection restorate and optionally, a sectorality official readequir in an executary immon-negated besteria, park as distinguish, which becomes be an enhanced options of these. To a profession outside according

•

PCYCHENITYPE

tax mirrealizes, the commenced release in reservated with any revision of a release factor by the agreement manor expensel buctoria. In one controllerest, the relation allows unknowed selects of efficient medicacles flow the eptoplesmic or periphentic space. A relates for may be endoproces to the extensional armonargeted beneals or History progenous (i.e., contridet by a excisio and projectale that as not maken to the commenced manage-surgainst 5 bacteris). A relates fector may be exceeded by a contrib sold comprising a phonon, or by a

- analog sold which is knowned into the government for successed honor-unional butteria. pulsary affector maintain, or by a expectio models arise or peaced. A referre factor to he encoded by the power contain souther please; of they exceded a sector day officials:
- 10 Includes, or by a reporter metric and or placeted. In a professor makedinary, the release figure is a Baselvinois Release Provide (BRD). In a specific confedence, the DRP is that of the observe DRIS placeted, our of coloris ELES playmids, or the coloris A, K or D photosis. In a professed embracionar, the sace is addressin DP13 (pCtoDF13 BRP). In student embediatest of the investige, the anisonal classes system comprises
- The present increasing also provides angenesion of a feature protein of the inve in, an expressed turns t-bargered by ctorie, oneb as Subscapelle, which becteris has no columned as lease system. In a greatific confederant, the release flatter is expressed in a cell which also expresses a funion possion comprising a primary effector analested found to an One-like provide. In this contradiums, the en-expension of the robust fitter above flows for ontained referen of the fluids promise them the periphentile space
- In one embedies at, the present invention protects suctions of delivering high basels of effection minimales or fusion proteins using profiled, alternated turnor-engand and of becoming winish polectively accumulate within turnors while expressing the
- officer policules or flates positive. In a specific made, a readilist, escribit states targeted single of backets activity and files of the committee within teature. This is the trackings of the following sections are discussed, for elemphoty, with selectors especifically so Swinsone Ma, the compressioners and entain is of the Revention and in an way means to be continued to Subsecution but concerns any which business to which the teachings not by . Specifically, the Invention provides an attenuated in mon-singular.
- bannetium which is a frontiere season or benittative assertion. Extraples of asserted to recorded to recording season is a factor as extraples of asserted to recording sead bestoria include, but one upon limited fig. As developing out in admitted manoccomine Comerciais and Samonella mp., Shyrifa spp. Virginia enterecolates Line to near extensiving, hipscolumns howing, and iteratories up.
- The pretent invention also providing plantamental compositions computing a phenogeneous by supplied continued as stressed to not despeted become engineered to compain one as more muchain sold profession encoding one or overspringry officier

- 17-

escutional representations commissions plumateratively more paths earlier and we attracted textur-largeted became as proceed to contract which we contract the contract of the process with the well-codes enoughing one or state persons with the well-codes enoughing one or state persons without and analysis for the contract well-codes.

molecules and one of these according efficient molecules. The present invention the partition phornacterized compactions compating a principal content of the processor of the p and an elementarial content regarded framewish regimental to constant one or story profess acid

- eles enpoting ons or more finise paperins of the investion. Families, she present havrarios, provietes phenasocazios) compopisions compristor, a phenasocaziotity ecospobilo carrier pad es securencis suprovengental bacturis explinatoris to contain cos or more en cicle nd resolveniles according one or more thesian proteins of the invention and ope or enter or reciercios (i.e., primary eritori escendary motorsica). In a preferral embediance
- the artemetical respectangement bouncing as Salamonalia. The pharmaceretical conspositions of the invention are nuclei his the treatment of
 - wild nation. Solid runners include, but one yard limited in, surrouser, questrosses, Symphotone, and other splid towner contacts, bucketing, but not likewood to garps him states. Essent of the count nervous system, brancounter, provide center, orested context, which causes, long canter, everlan expect, enabled exacts, flags canter, everlan expect, enabled exacts, flags canter, everlan expect, enabled exacts, flags of canter, interested
- ficros, passorens canoer, sin mach cescos, liver course, colon cascor, colon cesa, see er, binader censer, avei evenothelinene-The passent investion provides treshods for delivering a printary effector restouic
- By the upacread of a solid terrain colour colourlakes associated by the analogy to an actival, professity a measural and most professibly a human, as prood of such (recessor), a nonelical compression compresses, as astronated immortangeted brotosis empireere
- to creative care on most amorphic constructions as noticed about arrive injustry, editors. nates des. The present invention also provides notibed: for delivating a priority of the 25 reviewed: for the treatment and a solid sugar, cancer consprinting administratory, so an executing preferably a preferably a preferably a preferably a business, to used of some freezement, as
- dynamics approximate control complete confidence of the control of molecules and our or more accordary effector indicates. The prepara investica also 30 populáse methoda for delivering a pelessoy effector reviewals for the personnel of a sold
- Bittor concernos quieleg administrating, to an exercit, professibly a statement and study professibly a feature of a contraction of study a feature of the contraction of study and the contraction of the contraction of study and the contraction of the contracti to action orange as one constitution of beneating in arteria of beneather the contract format for the contract of adentite enteding cus or soon fesion proteins of the levertien. Further, the contest
- 35 important promises promises the deliberatory a painting effector prolocate for the treatment of a solid terror capter comprising administrating, to so colonal, proximally a measured and most recitably a teamen, in used of such measures, a placemacratical consposition

PATRICULAR DISTRICT audite soid wo locales onco they was or more flestop prouden of the lovertien and one or more existent molecules (i.e., permay united amountary molecules). As a professive exchadiguese, the assessment them to surgered because is Subscription as a specific words, the arturpussed flamour -bargate/d beckering perceptions and exceed reference systems.

- In owner emits diments, all tracefold tracer-stagged between seglecond to supder ou other attraction meny annivement among that out ou after a agreement among at any and an anniversal and an an anniversal and an an anniversal and an provides our his read in conjunction with office transmissions Campbe. For example, attenuated to soon targeted factoria conference to experie one or more recisio acid malouses enerating one or more effection molecules sudder feeloop process are to used it
- 10 application with a characteristic agent. Surrenders of characteristic agent include but are not fimiled in, eleptacia, afterfacido, pacificad, suspens, repoise verse o l'inhibition forg. CFT-11, topotenza, 9-AC, and GG-211), generalizing visualities, notificate, 5mencil (S-PV), bucoveris, vioquelline, tempini, usus, cyrorbalaçis B, granici list D procise, mismycie, 400polife, troopolife, vipristies, ristianies, odchicie, dominicis
- (-dehydrostelastetone, stelpladae, glattacontinolda, processos, fotoscito, fidutaka, programatel, and present value becomings, and cytomer. Alterestively, recommoditure targeted bacteris coginoscosi to acpressonat or mono asolato acid materiales on colleg car or more effector analogathes entities factors proteins can be used to conjugation with antitation
- The propert in vertion includes the sequential or concomitant admicraces against and allowanted hierarchargeted bacteria engineered to represence or more mucicio sel di inglio cui en escapi ne caro en mora adiitotar anglocation antilior funan protesio. The investion recompored combinations of mail-cames agents and attempted tumor-34 sectional principle entirements in exclusion and as security and automatic contents on or more officeror molecules analyse design projector then are added the or symmetric.
- The irrestrict also exceeds the condition of anii-omner again and altern burser-lay point it posterily enquirement to exposus one or space succition will maintain specifying one or more well-clar medicates made religious provides that he we different sizes of parties Such a cotobiomistic provision on scoperied facusty based on the chall action of there
- terroposites orbeiber the countingsion is synoghed to additive. Thus, the notes ranismed the rapy of the second inventors yields improved efficacy over either open rand as a single-agest blosspy.

3.1. DEPOSITIONS AND AMBRICANTIONS

As used breein, Solmonella encompagne ell Solmonella species, indicing Sadarraello pyrisi, Suimorella choleranata, and Reimpurila crossitida. Sassyyes of

. 12.

900 01/32/2

PCY/039043241

School-Size are later secretopress it bronis, the countryles, typicheumics, a deligroup of Galacces ide antivitation, anomalog retiremed to as disferenced by spike vertices. Another; As introducting delication "washing" shallow to a podycycyclic delication or principles or skychicum Assertion are getlanegy or associating efficiency and produced to consistency of the country of the country of the country of the country of country or executary country of the country of the country of the country of the country of country or executary.

- edilestor unifercule, or powers a buildar or landerial attenunce of a princip or secondary or se
- 10 effects 179%, se teats 279% over hear 1799, affected to the survivor of terror of 17 pillioning or convenience will have an interest described interestic (the public project de cettered the survivor of 17 pillioning or convenience will have an interest described interestic (the public project de cettered the 18 mail cettered projects on the through survivorient to the mail cettered to 18 mail cettered projects on the cettered projects of the survivorience survivorience survivorience survivorience described the cettered to 19 mail cettered to 18 mail cettered to 19 mail cettered to 18 mail cettered to 19 mail cett
- 13 restores, 3º least 20 compagnous senteno Astrollemonies, 3º least 20 configures a series nature existince, si least 20 configures anterio materiales, si least 20 configures anterio existince, si least 20 configures quarter del configures quarter presidente, sa lettera 10 configures quarter del resultante, si least 20 configures anterio anterio existince, si least 20 configures anterio anterio, si least 20 configures anterio anterio anterio existince, si least 20 configures anterio anterio existince, si least 20 configures anterio anterio existince, si least 250 configures anterio existince, si least 250 configures anterior existence anterior
- 20 megracor char in an Inam Afrik, at brans 2006, car brand 2006, 2 Mester 4506, at brand 2006, de treat 2006, a see est 6006, a 1 treat 6007, a 1 treat 6007, a 1 treat 7007, and Inam 2007, and Inam
- 26 серестия на в увинат у съобращу нашени постолно наименно и почене что и не достигната и не поможения и почене и поможения и почене и почене
- Anti-origingamio farror: An enti-enginegerio farror in em y prodessora i motoralo wideD tata servicing/copio estivido; or a recisio soli escotia; está a comata socia esta value. To a periament embrio farror, dia sesti-angiagnalo fatror in a popido fingaren or observar desposor of a large protein.
- Attenuables: Attenuables and an actification to that a micromposition or voter is too.

 pathogenie. The end votels of intronsion is four the visit of touristy as wall to other diseffects is decreased, when she witnesseemen or vector is administrated to the policy.

30-

Busicalonia: A becamining in a bacterial postatements to allow it adoptive additing in that his barrarial least to immugate to the toruin. Securicality only be executed by the baseofal look procure or by replessed, way belooks to a bead or mesow stape of other kesterie, and may have a slough plantum complicity and or two polarity or may be a multi-subruot province. To edilatere, e host expression a becreeke in the immedia agraes

- Chalating agest executive Chalating age at materially it decised as his affective retraffice at which besteria problemation is affected, or the constant who at which the which the of bactoria, no clearant processors as are repo, or one conclude them is a system are which they detected, no clearant only to contract the colory for graining such tenth. It restricts the contract of a "downstree of a "downstre
- a polypopuda" refers to a polypoposia thet comprises na nescos acid conservo of a polypopide, cush as a primary or successny effector projectele, which has been alreed by proprietors, com en agracars as constant sectors are recorded to the desired to the formation of artists and sold president adoptations, delayers on additions, or by the constant sectors of all sectors and by the constant sectors of a sector of activations? In much become in the expected of a "their misses of my intersystem according afficient state only intersection in a gaintage or secondary officeur must exact which has been personally of the or their must be been personally of the or their must be been personally of their must be their many or their must be their must be been personally of their must be their must be their must be been personally of their must be a paintage of their must be the must be their must be their must be the must be the must be the must be their must be the must be their must be the must be their must be the m
- complete attentioned in early type of embeculo to the primary on according projectals. Per managing, but not by way of limitation, a primary or according influence methods may be produtiest, e.g., by protectytic charming, linkings to a cellular ligand or other poorts, on. A characters of a primately of secondary affector analouse any to modifical by closelest modifications using techniques howen to farm of their at the set (e.g., by seyterion,
- phogstoryteles, certoxylutes, glyconylutes, relation modification and collection). Porther, a derivative of a priceary or mountage effects; molecule unity contains our or as me-chanical economical R. A polyagated during the processor a single or induced floridary as pricarry as encorably effects a solution decided basely. To seem "therewaive" in the question of a "One water of an another more present at money and
- Submandia usanze" redorata is madifind zusiki Submandia manazi ni defined in Engandonal Patiticarion No. WO 99973053 ni paga 17, incorporated hardin by collectude in Programm: As used become the torus "fingurant" refuse to a provide or you provide
- 10 comprising an amino and sequence of at hard 2 configures minima schi polytics, at least 5 couniquous amino acid resident, at hear 10 configuous ambo acid visidos, al foat 15 consignous prices and conduct, of feast 20 was ignored assets and scriptors, of least 15 consignous applies and profiless, at least 49 accordance writer actionated as feast 49 accordance writer actionated as feast 49 accordance are feast 49 accordance. coefficient arrive and residues, to least differentiques action residues, at least 70 35 scordigarous station stated regulaters, or heart constiguous 90 states point stations, or least
- configurate 90 acrises acids residents, at implementagement 100 artises wild pushfull, at heart contiguous 175 amico sala rendum, et lossi Liti contiguous amico sald resident, et lasce

TOTAL DESCRIPTION

YAC89092324 t

coulogueur 176 contro sold residues, as least earlignous 200 cosino acid quickens, or at least configures 250 amino acid certifices of the animo acid ampenage of a primary or occupacy of fixed animo acid ampenage of a primary or occupacy of fixed animo acid.

Paroxidoral Enginom. An estal lamelo, the mess "Sim; threat Enginemi" rether to t.

Signerate of a primmy or secondary ellerted malekeab dut estant as back one thankens of
the princety or necessarilary effects; unabout 6 (e.g., secondario activity, test-sector princety or secondary effects; unabout 6 (e.g., secondario activity, test-sector)
mitrity, or 645-lamest extirity of the officers producted.

Parish province: As used borole, the torse "faither problem" refers to a polytopylife that enterprises on neutro-sold expenses of primary or recordary officials included, or fine should fregenant on derivative dismost, and an arrivo and a requestion of a Reservingsian

Business Engineet or devinates through and as a price and a special ordinates to be according to polytopide (e.g., a mon pulmary or man or polytopide). Only like proades: An much instruct, on Oney-like proades: An much instruct, on Oney-like proades: and the standard onto

candicate servicia, or portion ficans? If a p. Repair in grants, busine sequence, perighteens or septem, mentioner thanks, meligic entrementative devalues, or conditionative functions. In September of Section (1998), and the section of the sectio

(PAL), Papa, Plack, Narph, Nerph, NerpC, or a stajer mass consistent lipograms (such as LEF), etc. Purified: As into intak, "pastind" attenues transporting and inclaid stale in

30 orderinetality there of crammatine long proteins or meritor acids if rug. Adultic Bone detail baserals, or modes. As interacted orderer-segrent directorial artists in this is not operatingly that of crampating parties or meritor make landering reproduction of altrovated absorberranguard bacterist, bening thesi data where \$90%, \$95%, \$95%, \$60%, or \$96 (by) day helping of contractionality or cramper or manuscular contractions.

consequently provises of ranges trial.

Bethess observed in seal between the section facilities any possess, or functional process from the section for the se

Ompair shocks: Segme alook is a state of interest organ sither, are to a complex options execute, initiated by TNF-a. The relative statily also successful or review a edited TNF-a is used as very account, included an initiation and little to behalve supplication. There are used as very account, included an initiation ability to behalve supplication.

Tensor-cargeded. Tunner expected in dishnot up the policy to make a spintree of the control tensor of tensor of

- 22 -

Marina

17050031241

Visulance: Visulance is a solution term describing the general shifty to cause alleges, notiving the shifty to bill assessed collect the shifty to their south at call (see apositio definition below).

As teed broke, the studie designations Yv000000 (Immunative of Politication No. 970 9911900). YEST-09 and 22 22 purpose intertopological and rather on the order of Coppolate Wild has Assertion "Dye Coffee Collection and seldingle down pains 16, 202166, As used large large to the common and the common of the coppolate will be seldingle and the common of the coppolate will be seldingle and the common of the

The present inventes may be underlook once failly by reference to the following deleted description, illustrative examples of specific entered assent and the uppercial feature.

BRIEF BLACKSTON OF THE PURPLES

FFG, 1. Coding sequence for the remare fundate THF-ot. Both DNA (SSQ ED NO.3) and protein (SEQ ED NO.4) temperature are indicated.

PIG. 2. Decimation of the Safamentiar VNP20059 per C-stocks

35 Fig. 3. Thirties, expension from a obscurage stylenogram for province drives Thirty, province School of Tryphic and the stylenogram.

FTC. 4. Coding requests for the symbolic Oracle signal projection (includibles I-CO) derive to the motion bissons THT-sa (includibles CF-540). Such IDIA (SEQ 10 NO.77) 25 And probab (SEQ ED NO.75) engineess are indicated for the Assistancemptons.

5 And problem (SEQ ED NOTAL) enquences are indicated for the finish consument.
FEC. 5. Peripheranic localization and processing of an Chaptur TNF+e, having postein

30 Fitt. 6. Cooking sequence for the Compt. segred requence (unclocking 1-69) finder on the number Futtom TSAH (mentionising 67-889). Both DNn: (SSQ 3D NOR9) and gocaria. (SSQ 3D NOR ITS sequences for indicated by the discort construct.

FIG. 7. Supervision and processing of an Greph TRASS. States protein in W-ooking (FM-00).

-23-

900 01/03/84

PERMITTERS

FVO 8. Cooling sequence for the medified Compt signed sequence (nucleosistes to GS) feation to the materia (CFEXA) lasses R. & Restleening 66-622, Back DNA (SEQ NO. NO.11) exquences are indicated for the feation construer.

- FM. 9. Expension and proceeding of realers former IL-2 Apades the plant(SL) or only 4 (SL) symbols algorithms.
- FFG. 18. Coaling or governor for the smoothird global nignest requires (moderates in 60) Surion to the contrast (C LISA) hunters II.-2 (markets) is 64-660). Both DHA (SRQ (D NO 13) and protein (SRQ (D NO 13) and protein (SRQ (D NO 14)) and protein (SRQ (D NO 14)).
- FIG. 11. As who and themse efficient of an amounted prain of Subspecific (sublimation expecting the matter form of legran TWF-s.)
- PIO F2. Billion of their expression on anti-neuror efficiency in term. The figure shares

 2 graphic representation of treats among also considere of a CFSELM muscle prophetical
 with Billion to the contract attention of the PITE of contract (1) VCTSEME and (8)

 VCTSEMED between a despirer is planted, which completes the SEC point.
- PGC. 11. According violated on of Begd grate access makes what the recent of the good post if potentiate and adminiscential. PCC. Use According to the control induction of the page access to be recentled exactables of laws are asset of Selections (1). TRIAGS and YMPODDOS (PCC, 12) of exactations and the in the induction of Beg all in towards, first of VMPODDOS (PCC, 12) of exactations and in the induction of Beg all in towards, first of VMPODDOS (PCC, 12) of exactations and in the induction of Beg all in towards (in purpose) and (in page 2). Age, in certific and (in page 2).
- 23 P.O. 14. Torsery bins to doubte of P₁, 21 gain copromise needs the control of the Tet permateria Schoolse, The does companie Ladiciana is large response to Teacy, this up to a result of the applications of Type (2, 1994), after which there response declars, proviously up a result of the artificials function of Transpolars.
- 795. IX. SEZERACION evaluation (ShoreVIS-carlosterily) exponent a from the planethy writer. (FIF. 14th describe expression of Healthit included in-despress from incoludgments of their translations from Engineels (CPECROS), FIG. 159 shows no expension of Health Production from the technique of Chemistry and American (CPECRO). Even resultant beam foliated outside from unbeload orbitals polarized orbitals produced their selections for companies from unbeload orbitals polarized orbitals.

YFO. 16. Segression of NevatiliS-endosted a Securitic pleased YA3334.

- 24-

SAD DUCKSON

CVATEROIES DATE

Howelth-continuous in and system fulfilling the recoverator) is take to express a band of the correct rise the Fermi US-majorantia (-25x1) by Ventras analysis with a sort-timivine artifoldy (times 1-3 correspond to eight independent classy).

- FIG. 17. EWany of VNP00000 odla expossing vederale on CDE attack odlar particles. The flyes shows a goaletic exposuration of menture playmer than of more productive of the office of the control productive of the office and control productive of the office of the control productive of the office of the control productive of the office of the office of the control productive of the office of t
- 70 TO, 12. Editors of VMR2/debt onto suggesting understand on EAD1 languages called extractions. The flower since a proper regularization of country term to over these of a read on the properties and contributed IAD1 to bend a read with (IA a TRS country of the AD1 of the Country of the IAD1 o
- FEG 19. And qualiforative extinity of byposta four alternated cannot range and Solameth expressing leaves endocated over-sided cells. This figure stress can with Union of America with methods and PLATEC predictories in our operate to 1970 mad 20 fest corresponding to 8 or 10° beautiful. As a courted Gallowskie consisting the month plike made statistical data for point in a manufacture principal size values from proposessively consistent. Supplies are annual elementation of Promote of Platestia.
- 770. W. Ast qualiforcities underly of bytess from the cases involved particularly and the control of the con

300.21. Communica of the pill shuttle of Verse.

FIG. 22. Construction of the CVI ENCAST Victor (Constitut) According Number

AF 1927(9). The notated is sequence of the CVI ENCAST Victor in an deplaned in SEQ ID

Not 1. The CVI ED CASS Victor complete 3 open conding themes as deplaned in SEQ ID

Not 2.45, remonibuly.

-25.

SAD OT USE

PCTATERUSSIAN

FIG. 23. Construction of the Col 50-CASE/987-1 vestor

- FIG. 24. Bar Graph aboving the expensit of lethol units of collects ES produced by
- FiG. 25. Halo cases for various strains expand to virtualistic light or a capa.
- FIG 26, Efficiency of 41 2,9/Col 83 on C38 marfet roles carditoms.
 - PKS, 27. Anti-paract sensity of 41.2.5/Onl/E3 on DCO (become colon curricators in
- NUMBER OF CO.
 - PAC. 28. Efficacy of 41.2.99(cl.83 on bits medice tradecours.
 - PEG 29 Cynotoxisty of Solomovilla expressiby closed E and CHFL .
- PIG 30 Elela cells expend to CNF4 (A) show subsequence and cold makes been exterior to nament Help colle (0)
- PSG. 31. The world postion of the pCVD442-sudB vector is: the 3' to 5' extention. (as viewed in the Fig. 3.2 map), with a deletion in the smiller of mote and contribute. internal Mort, Pari, Spaki, St.L. Swell and Dreit polytisher in its place (MEQ ID NO 61). Son PIQ. 32.
- PSC, 32. Reveloritos respirad ademissão un file pCVSD42-meitá encior for obserge 20 Na. in the Discolêt region and attrasporte terretion on the observaceure, multifact, etc. 7 and 3" regions of Orecolôt; molo 20%, the mobilization element in order file tho planets to be transferred from one creation to accident. Also, the best abstractions gave which sending emedialty to b-lecture antibiotic nurbus curbusicitis and exploidist socil, the gree which confus examitries to success.
- 250, 35. 7) SCYDS-CE-Tabille AB restor, 2) base bigus a cost identifies with the Datable determination drop in Schoolsele YSS06, 63. 5) determination between drop in Schoolsele YSS06, 63. 5) determination between drop drop determinations in cells (INVDS06, 4) success resolution positioning in trade 41.2-7 to EMPA-56. or MINIX, the place of placed or individual productions, such 65. 5 to mobilishesis are sense of models of the placed or individual productions.
- from the state to specific, any; the box-includes gave which couldness searching to b-

-26-

With DILLEGAR

PCYA039043244

Incompresitionic auch an executatinia and ampenilies, each, die gates which confers gazartwity is awares. Moter wer decora to mode.

POL. M. Percart syaremating of tellERPAR above 906 and shore 874 comprish to positive seal regarder seasoning (EECHO and 41.8.79) billioting 72 insent of registers to SECOVI cells (see 1902). Billioting 40 extensions see seasoning to prescription below of the SECOVI cells (see 1902). Billioting 1902 extensions see seasoning 1902 exten

FIG. 15. Halo formoleta es block ager for attenuated textner-largeted Shinstelli al.
the abstract of interprint of (A) and the president of interprinting (A). This formation for
abstracted for horse agency data facusation despirated the controlled regional of severaabstract and an expect data facusation agency to a service of interprinting (A) and for presence of national or QDD, block instruction for
abstracted transcriptions (A) and for presence of national or QDD, block instruction for
abstracted transcriptions (A) and for presence of national or QDD, block instruction for
abstracted transcriptions (A) and for presence of transport or present transport state factors (A) and for
the abstract extraction of the presence of transport or present transport transport transport transport transport transport or present transport transport

[5] P.G. J.S. (A) Az illustratum of the TAT-upoptin fesion protein triberel the headstability top. (B) An illustration of the TAT-upoptin device protein with the horselectability top. (C) A) An electronic of the TAT-upoptin fesion protein with an Ougo-A-EL input insquares.

FEC. 37. Cooling sequence for TAX-appgins Entire provide. Both DNA (SPQ ID) NO 57) and protein (SPQ ID) NO:38) sequences are followed.

TNO, 38. Cucking empirators for branch still from ATI-myopoliu Assista, promiss. Both 25. DHBA (SEQ TD NO:699 and protein (38Q ID NO:69) responses are followed.

FSG. 36. Efficiely of VNTSCOSMYSTANCE continuing through an M27 long conditioning growth in CSTRLA state.

FIG. 40. EXECUTY OF VIVEX-07-bindensych continuion through on bCCF long continues growth to CEFRIL-6 mion.

FIG. 41. Biticary of VMP200900 inplease combination through the M27 longcurring provide in CS78146 releas.

ä

September

octationness

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE DATENTING

The ground inversion soldings amounted becoming with their of the series to be discovered and their single best of the series to desire which we have been a few provided and their single best and their single series and the series and their series and the series of series and the series of series and services and series and s

- The strenated musc insequent least actual abused delivery cyters groundly described provides that delivery of our own eyes delivers medicately to the stace of wide strenate insertions provides such and afficient acceled by which a primary efficient evolution which may be some afficient acceled by which a primary efficient evolution which may be some understand and the efficient, or unswared terms endagined affect of what delivered provincially in a best, one in efficiency to leastly to mean thy an attempted to receiving and has latest and a Schwarelle entire formed to levily on the hast.
- The successor elso provides considerated delivery of one or more polenty officials tradecately and cyllenelly, one or more receivery effective molecules () which see chilescoping a parameter company appeal descripts, and polyalocules. The invention also provide a contestable of either yet of different assembled manufacture appeals contestable and provides contestabled either yet of different assembled and manufacture thereof is confident and a manufacture and the second confession of confident and confidents are more afficially as a manufacture of the second confession of confe
- Cost or man different primary effector enclosely(s) and/or optionally, one or more diffe repending effector molecular(s).

 The persons in reading allows provides medicularly to be all delivery of cas or more

the persons in section and powered statement are that deletely of the second removals. In one organization of the deletely of the second removals. In one of the deletely of t

- De compressing exignal populos sur la visibrare notates. La sentitar orbadiciores, inventore nauco-compris la novira na enquesend le cappera a Tanas, colosi conceptide el señonal pendo, a genovajer de Janas y las, and an efficient notalesch. En aucriter embodiciores, and an efficient notalesch. En aucriter embodiciores, and an efficient notalesch. En aucriter embodiciores, and an efficient notalesch. En aucriter exception en applicated un especial a réchta protoco conception par a participat des des offiction notations. In acustar accidentation, infrastructure reconstructure de la confision notations. In acustar accidentation, infrastructure reconstructure de la confision notations.
- 3.3 Except not explorated to express a finishin protein compating and goal oppide, a forcy process soft an object or state of the second carbodistical, and control of the process of the carbodistical, and control of the carbodistical carbodistical and control of the carbodistical carbodistica

35

lipic charage site, a ferry pupilis and an effective molecule. Attenuated extr business are organizated to suppose out or recut fisteen protects of the investig age or main effector acrievales of the investion.

condicatly acceptable carrier and an attornated tumor-improved forestric engineered ne markés polé poplousies mouding and or more persony effector molecules. The present investion also provides phecuseous set compositions comprising a

les and one or prore recondary effectio trades des. Facilies, the pr Examples by the control of the contr motoculus execuling one or more italian participa and one or more effector explanation. The process investible provides entitleds of treating collect terror consens in an

animal, said verticule conserving administrating to an animal so send thereof on electronic one or more prisary officer asolatales. The propert investiga also provides musicals of browing polici berman summers in an autimat, and method to experiency extraction ing on ea animent is second theoreof me attracested beautic designated beautifue engineered to express one or

20) stages populario scial medicardes estatuling one or mano primary efficiency emberolyte and esta o more secondary effector malepailes. Parther, she precord invances provides methods of trousing solid transit corrects in so solvers, sold motheds comprising a definitioning so se neignal is used the roof an enumerical numer-languaged bentonin confinement to contain con-m more medicio acid malberalus racading mas ar jugos finden proteian and ano or more

25 efficient molecules. Fredericht, elecations in a mourmal (e.g., c dag., c cap, a bassa, a co na sa cheda, but are not limbed to, raceorus, envelopmes. Iganghorus, and other solid turner connects, incheding instant facilitation, beauti expose, processes custon, exercisal expo merino canoor, lung ono co; overles ourser, neglicular succet, layous coros, autocytona,

36 Silvers, Sundertife course, the moch cancer, from execut, color cancer, control cancer, system remost, germ well like cancer, melanoren, rezul erecor, biadder cancer, and

Although not insuring to be furious to any our mechanism, the investors better that the present investing receive in the targeted expression of the efficier molecula(s) w 35 the site of a terms by dalways of datation cried to encourage of basterial vertex anniability the offer terms by dalways of datation cried to encourage of basterial vertex anniability.

9/0 00/28293

PETERINA

Por resean o'Carley, too desibed description is divided into the following solecutions: Bostoned Vectors; primary Edition Autorius for Power Turrays; Secondary Officers Motorius for Congressions with Filances Efficiency Additions, Indianterior and Arabage Petition Provision; Deposition of the Manager Efficiency Additional, Indianterior and Arabage Petition Provision; Deposition of the Manager Efficiency (Congression Vehicles; and Jaiotoche and Conspirations for Positions).

34. In CONDENS, INSCITUTION and the second of the section of th

g may be noted for construction or endoction aggregation be becomed a strain due can to the a standards of the materials. Because the standard and all brokes proceedings and forwards of the standards and standards and standards and standards to the desired of the standards. See all standards to the desired of the standards and standards to the standards of the standards and standards and

20 improving a virtual control and provided a province of the province of t

the obliving of the set of new primary offenders melacutar for grant and the set of the set of the set of new primary offenders melacutar for grant and the set of th

30 Impact histories which is conjusted to require on or more created trails quiescale entertiage effects an administration and relative from proceedings of the controlling of the controlling of the delivering profession and protection from the remarkable and in the comprehensive and accordance for the invention and in our greater to be consciously to recognize any more than accordance to which the controlling superfy. Such administration and the controlling superfy and accordance to the controlling superfy. Such administration and the controlling such as administration of the controlling superfy and accordance to the controlling superfy. Such administration and the controlling such as a such as a superficient and accordance to the controlling such as a such as a

PETERMINAN monophymeton, hipocylisanse facende, Simplecopuse sype, who will the backstern is a familiature scorbs on thoulasters susception.

S.I.3 SALECUMELE & VECTORS

and bectarie our be modified using the westing of the investice at etocide one or more primery effector molecules and optionally, ess or more acceptory officies molecules to you have a savel estember transfer respect of sustains works. for the delivery of one or reore effector replacement of the because to a road surrer. Purther, my attenuated succe-tergoted backers can be reaching using for teaching of the investion to excelle one or more finion professe of the investion and eptionally, one or offictor sophrasky to predict a norel interested tensor-targeted increds weefel for

- the cellusty of Justice possible and efficient mobilities of the investion to a cold tracer. Bacterie ments an Andrewseella et a consentre agons of discour in harmour resistantes Can such electric that one be covered by Sphannette it supper, which is a sensor problem because of the high mortality rate associated with the court of septic shock (Home, 1998,
- Clicked Microbiol. Equa. 6:57-69). Thomstore, to allow the safe associated moved works in the present two-points, the horizoidal versions and as o'absenced are attractored in their vintance for coming distance for the present application, exequation, in all them to the traditional definition is wheth a mission regular vector is not differ to that the nacroproperies; vector is less perbagants, it intended to estable also the modification of a
- ergunien vestes so dassa Jones thas of their desired values organism vectos can be endonio interest and an endone of the property of the second and t bigues saint of the parental states organizes weater. The end consideratives to recise the sirie of taxic shook or other side offices due to administration of the verter to the profile. Suit afterprive baserin are leadered by seems of a sembar of wellington. For excepts, anterestion can be arbitred by the deletion or discaprion of IPMA sequences which
- rd overal libro wa easyladion well-purply to cortain deals. Self-purply the capital partern the set will beclude, for example, bearologous recombination, objectional implayerable, endation variage reals, or introposes succeptables. These veriforce factor that are associated with narrival in macrophages are assetly specifically expressed whiles the
- maximphages to response to stress elgents, for exemple, ecidification, or in sesponse to host cell deficiers mentanisme tuch immorganismy topis (Fishis et al., 1986, Soc. Fast) Aced Sci. 125A 37:5189-6199). Tobis 4 of laurenticest Publishics WO 96/9878 in an idustrative hist of Spinosonia viculesco factors whose deletion society to extravelors.
- Yet another exched for the attenuation of the bacartal vectors, push to Subner is to readily exteriments of the bounds which are perpossible for the texisity of that harteste. For exemple, Epopolyteacheride (LPS) or endoscula se primarily empussible for

NO sustan

the particular and effects of housestern majories. The companion of LPS which condit in this response is light in (*LA*). Elemention or maligation of the write effects of LA matrix or any promised become state of the section of the 2) Replies force of the basseries vesser ass, the solorated.

- Altering the L.A content of Imporphs much on Subscission, care be active at by the introduction of reunscone in the LPS biographotic patienty. Several entymolic steps in LPS bicognitures, and the greatic local controlling them in Settlements have been identified (Rance, 1993, J. Basteriol. 175:5745-5753 and references thereio), as well as consequenting companies. Clear such all setemicro received to fired, a meabolon writing the gase that empotent it is
- empare (IDP-X-C(R-10 hydrox) moreous) Lytposysymba të asykmus listas, chish nggist et tha thed anys fra endetwich biosynalisels (Kolley et al., 1992.), Biol. Chans. 243-1945-19674]. Estateisi sistam bosting this type of massic product a Bold A data citifers from wild-type lipid A in that is committed prevently flaty well, a knowlectured sold (Nay 1916 Colonian, 1994, 1 Basinine, 178:1639-1646). Roy and Colonian discountered that in reliction to blooking the third step inventurion binay release, the first mouther that decreases enzyments enterly of Sold A of binary that regulates the sively stop of lipid A
- To addition to being attravated, the bectorful vectors of the carculator are tuntortargetes, i.e. the inchesis preferentially strackes to, refers, and its sensites visible in a compet or avenue and vectous a exercist stepon, step-temper or seq-temper cell. Suitable worthcome and summer targeted basengle are denotibed in Section 6.1 (pages 25-32;
- hanne-targeting) and Section 6.2.2 (pages 49-51;attemption) of International Publication TWO 96/46238, which are interpretated became by reference. As the receiving variance ray trightly appetition and super-unicotion, the difference between the sumper of university became found at the larger larger or twacor or like a unsequently so the una-expectative cognitive parts. the account a regard and began as the district of the account precise solutes is becomed much
- that forms them of astero organism vocases our be used with positive untake. The stoletic hatta poses scorborg of bases and case case \$200,000 OW societa about Economous as books surpor-bargeted. Subsociette or non-Subscrapite barterial vectors. As Unintrative express of an aniemated recon-legisted bucterium tarring on LPS
- very mutant is the medil' Submountly renotes described to facessarional Publication WOOD 1805), which is interpermed basels by reference be its excisely; and expensitly Sucrece 6.1.2 which describes the giamenteripie withs suchB-Subpossile materic. Out observed state of the sector Carle seeding is docreased shifty to instruce a Thirt-e response conspared to the wild-type backeted vector. This mater Salverwello instear ToT-a
- supression at levels of about 5 persons to should 69 persons compared to the levels indused be with type Schwartin.

-32-

PITO OLUGBE

Demonstr

THE or experime inducatility which because in absent to profice 125 cas for a mercedule where of in removing generativity desirable depth provises until a life paragram. Induced learness until (ISLA), Comparison of THE approximation as a per tradering Removing und (Y.L.Y.) or on a guidge later, a made in determine making withly. Lower THE-4 which can apper until relating desiration for the THE-4 production, the profit of all analysis of the second of the analysis of the second of th

consciousnes, the media" Labourerilla record is an effect to consider an among attempt effector publicate(s) and operately, can or more recording effects; molecular(s) of the investion.

The process investion who accompanies he may of defined by a definition of media restriction.

immensageled Schoenskin netwerk. Devinierte of excit streament teason expend 10 Jahrenette ministe des le sconsidé à Laug tie le solange de les themptes le scond cort es more paiser y effecteur inschlachte) des destauges de les themptes le scond cort est moleculed to produce a serval semanada mous despread bampers avail à la bis definires of one or carrel afform molecules del cinè semantes en produit bampers avail à la bis definires of one or carrel afform molecules del cinè semantes en produit bamper.

The prinking of the attenuental plannings is important and, that the strain from the source to a some resulted plannings desired the savers of recovers of a partners. Seek a stability on the mishand, for enempty, by promiting the set or indicates one in distinct, for enempty, by promiting the set or indicates one in distinct for desired by calculations or other source was resting multilayer on the characterisated for if enforcing

Analow method of exhaughte measured phenogyne to conjour the househ.

A producer, a second of some those recensor, e.g., a measured in his partneys by this partney.

A producer, one to at the enable materies (Memorateval Problemium TOO (MINOSI)) set
once or more remainment to analous by the sen or sets emateries. It produced to the control broughts have paid to be produced and gradual relationship to the control broughts and partney because and analous of the
Bookman, 1996, J. Bettack J. MEROSHOS, Su perchands enhanced more described of
a midd Submental seconding or operation of a sets can policitary thinks carried to the set.

26 minor decembra se construir, los constituires de construires de programa de construires que la construire de la minor de construires de

Accordingly, any interested improvemental between they be used in the methods of their brimmings to represent and deliber according reference according to a possible according to optimized, one or trave sourced any effective replicately) to a possible start according to synthetic explories, as its abstraction makes eggine a bringly as a prosecution of exagents and not according to the property of their problements of the property of their property of possible according to the problements of their proble

of the invention to express and define open remper tision promise and quiet early, execut - 33 -

TOSTE Effectur molecules to a solid-basear causer. In professed equitodistants, the after tomor-impress bacteria are constructed to expose one or stored baring protein and optionally, one or more officially accesses.

52. PRIMARY EFFECTOR MOLECULES FOR IUMOR THESAPY

The knowledge for defining of princips (and option by presently) effector mode aligh by which were deprived beauty, such as followers. The official to ted gelbehand are processed and processed liza ked to popiido, polypopiido, perseis, puso mantialem by westifed presia, exc.). The larrentan. Surbor provides medials acid proteembry which areads the primary editors 10 molecular of the investors

The principle Sector inclosedes our he derived from my become use Accidency, Dur not Health Jan, anticode, plants, factoria, forçá, emi protista, os vintess. Es a peafered acriticalization of the invention, the primary effector resolved by Served from a accordant. In a more preferred includional, the planary official resolved (served)

15 Abort a Barrier. The principly officials mallocates of the investion concerns members of the TNF family, acts sugjegated factors, syncaptic polypoptides or papiers, system intibitary energypes, and fineciased fragment thereof. in a specific explodiment, the primary effector tenteralm of the invention are

members of the Triff fearly or functional fragments thereof. He waylot of TNF funds 20 members, lochicle, mater not limited to, mater accretis factor of (TNP-1), transcrete section (TNP-1), TNP-1 evined spontagin-inducing ligared (TNP-1), TNP-1 evined spontagin-inducing ligared (TNP-1), TNP-1 evined spontagin-inducing ligared (TNP-1). activation induced synchrise (TRANCE), THE a related week inducer of aperical (TWEAS), CD40 ligner (CD491), LT-er, ET-9, 000-01, CD401, Part, CD191, CD381, 4-IBBL, APRIL, LIGHT, YLJ, TISFSFIG, TAPSFIT, and AITBL. in a profound 25 unideditaria, a primmy effector molecule of the invention is transcrussive factor or (Toff-

unifications, a primery allowine motions of the spectrum is their results from a C100 or 3, many a correct from 5 (TNF-6), TNF-6-section approximation following Special (TNF-6); TNF-6-section accordant following Special (TNF-6-section) are considered and another of approximation (TNF-6-section) and CD10 liquid (CD40), of a functional frequent thereof. For pariety see, e.g., Europ. S. et el., 1999, Class. Opin. Japanesis, 11:340-345, et iet describes

30 permiters of the TAU family. Alto, Table 8 kernie below, lists close to and acceded test. respectivence of exemplery grantiers of the TMF finally. It a professed exheditment of the investion the galaxy officer applicate of the largeries is never security fields a (TNP-a), source accreate factor \$ (TNP-\$), TNP-a-soluted apoptoals-inducing legand (TRAIL), THP-e-related activation-induced cylothes (TRANCE), The contents weak

35 matter of speparate (TWEAK), or CD49 ligant (CD46C).

. 34 -

	TABLE 1	PCYABINIDATE
		P PARKETY MEMBERS
	Classic Plassenceteers	Standardized Noncockspro
	LT-s	TMESO1.
	THEF-1	THE SP2
•	LT-S	TNYSF3
	OX40L	TNFMF4
	CD40F	TRPRES
	P.J.	THESE
10	COSTL	**************************************
	C030L	THUSPZ
	4-IBEL	THESES
	TRAK.	THEORIG
15	TRANCE	1987SF1)
	TWEAK	THEFTE 2
	APRIL	THESES
	MRT	ग्राकृष्टान
20	113	3242513
		1966F16
		7743517
	ATTR-L	postus

no morter specific authoritors, the prisency effects to should not of the investion are and excision special forces on timestood flagueses forces. The investigate of and supplying the flagueses forces, include, for are not include to excludents, inspection, approximate engineering particular and flagues for the investigate for the investigate for the investigate forces of the investigate for the investigate forces of the investiga

avegosist of incipies of a sure was VEGF people.

35

³⁰ Stoccoccio, a eff. neceptor amagenes, das 16 illas potoclysis improva al periodata, the Tall film percentylor improves of plander factured, that sub-captioners 24 exists and despress of particle factured, the missingraphic force designed (E.O., the animstopogetid 22 action under potolis improves of demolstrationals). In una dis-velopionis 20 action and proposite fragment of EPPRICE, (EDD and IVID), condemning peptidos, the seast anim-sub-proposite proprieta of EPPRICE, (EDD and IVID), condemning peptidos, the seast 13 action animal peptidos of EPPRICE, (EDD and IVID).

SALON OUTSEY

COMBRUMAN

to a positive disobolizona of the invention, a primary effectior molecule of the invention is entirelated. Naturally encenting metastation consists of the Comment -180 metas entire of collingue XVIII (GRNA) encetage pro-spiles forms of collingue XVIII have Collingue AVIII (GRNA) encetage pro-spiles forms of collingue XVIII have Collingue AVIII (GRNA) encetage pro-spiles forms of collingue XVIII have Collingue AVIII (GRNA) encetage pro-spiles forms of collingue AVIII have Collingue AVIII (GRNA) encetage pro-spiles forms of collingue avii (GRNA)

- In Instanctor protection of conditionant of the Lanceton is principly of filter condition for the Lanceton in publication for Squares for condition gastern or production, the salt for large Control Accession No. (Add. (2008)) and ACCESSION, Ampliantition programs controlly larged for the first impair to desire of productions; in Paging 5 in Street, Berngle A. (I have been advantaged from accessions, Langel L. 2 and 2 a review day not excessive properties the setting profession of the setting production of the condition of the condition of the desire properties of the condition of the cond
- 3 21,27941-25497. Associating the equipment of states associated of the states of t

5 describe of placeting on, which is a some popert judicians of anglogometric time against the against time against time against time against a competitude in legis demails: 3-4).
In exaculture professed particular of the servicules, a procesy effector enchange of

- (is a few colors is surface and in CL. Auditourable III). And is in related to translation and additional and incident the second of the promise and provide for the color of the properties of the monodature and antifer colors. Our properties and antifer color of the properties of the monodature and antifer colors of the colors of the properties of the
- 23 which (I) alons the retirection intends to better as the method and data intended and (I) along the time to expect it time to point (Corell, 1710). Souther 2073 [601-601, and office and the state of the core of the c
- Additively of their periods on a mild there is executing to the surefaction of his intention, the deciding of a control recording recording recording to the superior delithering mentioned be recorded. According to the period of the control recording to the control record
- 35 proceedings of control was a process of the control of the second of the control of the co

- 36

the investion is the <0 kills analyse 20 kills protectly it increase of filtraneous. The expression validity for those fregments can be gazereed by crandard contacts using th field largely medicic as all acquirects encoding too Observation processor process (Gentles/C Acception No. 2007(61), and a developing of the protection of the exceeded protect. So a preferred embediesses dus 40 kilos analtes the 20 kilos fragment of (Dyerrentia et our sessed sea cytopizatic protein mater the opposit of the are promises, for exempts by leavities

jam the printing places in In another publicand earlier image of the several and a principal effector study and für (Arminium is a musikum principlengen medienter (ed?A) receptes armigassas. In une sende of the embrid ment, the emegasiar in a dereskinst regaries sentum (f. 1274, (sen. e.g., Orominy aral., 1593, Proc. Med. Acad. Soi. (ISA 59:5021-5023). In confure mela of the

tershardiness, the extensivist is a propiete consequence or a feature protein themsel (Goodwor et al., 1994, Druc, Necl., Acad. Shi, USA 91:7179-7139). In yet another mode of the polynomia. In amognist is a developed regular polyble with receptor (\$60 <1 sl., 1996, Creece Res. 36:2473-7423).

In meter preferred corbediences of the levention, a primary effective and orale of the investiga is the 16 kDs bi-contained frequence of professors, comprising approximately 120 analog solds, or a biologically gartire improved through the coding soquence for protection can be found in Genback Assertains No. 1984_09(948). To a specific embodiment, read professor freguests her a CysSR - SeeSS motation to electrowene

undosigné cose-liviting of the protein by distillible boads. Jo author postorné embodiness of the levention, a primary officer moleculo al the investion is the 7.2 kHz plaintes frame-4 fragment. In a specific embedieres, the 7.9 RDs plants frame-fragment is expressed as a flaton problem wherein the animal tenteral 25 scorprises the first 35 senior achie of Z. out P-glassecratidare. In section conjudicates, the Regardie bireding, hydrace originates (bettor-1 are mustered to glutariate onlineorithes, which settells in a variety process buring percent national growth artistic (Makes et al., 1991, Current Res. 51:2077-2033). The coding proposing for phistlet factors in the Grobank

Atomion No. 164_000619. to awarious perfected emiss flowershot the lawcettion, a prisuary offector resisteds of the investigation and project consequently on the stationary logical IS writed on the stationary of phenic factor 4, the stationary in Sector designated TS 500, the stationary of phenic Sector 4, the stationary in Sector designated TS 500, the stationary of phenic Sector designation Sector designation of the stationary of the stationa gugiografia 22 umino neid procide fingerent of theoreticapoadis i , the suri-angiogratic R arrino and popular fragrams of SPARC, the result personage praise y aprides of Israinia. stancescript, proceedings on a EGF, or small provide acceptaints of integrit e. ft, or the VDGF recenter is a specific embediment, the parallegerations are expressed in tenders so har

protein partities. The acquisition of the annels populates are year ideality Can (1968, Prog.

Mail, Sabooli Bioli 10:161-176), with the exception of VEOF receptor acceptaints (Strine

er al., 1993, J. Best. Chem. 272:38582-51588), in a highly professed corbodiosest, the annil provide compresse on ROD to NGR model. So come a modes of the embediment, the RGO or NGR countries graphite in pursuanted on the cells a unit or of the bost become, the example by fisting the seciets sold exceeding the population from with a mobile sold extrading our or more extracellular large of Coupt.

for smother appoints controlling on, the pairway of team analysedes of the larveston are expression publicativities of populates, or foodbased fragments thereof. A symmetric polyperpoids or preparate at expressals or expressionic so a cell, the example, by inhibiting out growth through intended note with protein specialists of through throughout of the cell cycle. Such product may set by charving SDAA, of elboqueteoground, inhibiting an observation

they are, cleaning michile, on once transferment that reduced protein cyclistic to a brook such

- Exemples of cylotex to polyocytides or poolides in circle, but are not florused rees of the buckersoire foundy, wavenessin, cyrletorac normalic factor 1 (CNP1) e.g., & AND CHIEF and Filming State of CHIEF), speciming accounts State 2 (Chief), For investiga-
- multiscide toum (PATT), herrolysis, CAAX astrapaphies which we proved compatible intributes of firmary transferent, appears, the states, while, other ributorse loss tiviting proteins (PUPs). Passeries many repotentia, batchings; of DNA, KNA or posterio synthesis nac nacielo acivis, ottor recebolic inhibitora (e.g., DNA or RNA cinaryog soofecula scot as Orego and stomestones, passents, figure, plansholyeses, protrug correcting
- engycen (e.g., Cyrcidler bicaer from 195V and batterial openine (translance), light-souvaind purphyria, riche, ricre A choin, maize SSP, gricom, cytobolski dis todin, diphilicale typics, etgisterens mann A ettale, infebruserishin, britis, polymoral antibirtal protein (PAP), reliability profession (MAP), Disordine-32 and 3P, atom, manufalte, beyodis, abigs, a carriyes leftlifter of pasters biamericals two caramber seeks (see, e.g.
- later resiseed Publication WO 50/24579), Phendomones excessio, S. con Assi-Abilit torrin E. nell beautistics roose, EngoliC cooks torrin-1 (EAST), Volugionity active fregment of propagation and others however to the use of shall make one. See, e.g., O'Brilan and Sukuran, Propie Tonine of Fredericking and Subscriptio in Enthantille and Subscribts, Ordeler
- 30 D.C. for a review of E. and and Sciencesties states. in a preferred embediences, for primary effector replaces in a sember of the
- Succession family (fee e.g., Knolsky, 1952, Ann. Max. Microbial, 56:125-144), with the provens that staff hardernotin threthy normber in not a brate rise in where you is (ERP).

 Long plus of her rise in healy numbers, burnels, but one not broken to, Ordin, Coddin.
- Quilly Collis, Calicin L., Colacia M., otorcia OF13, porficin Al 122, capty/ocoocin 1598, junyrinio 7423,

WORKS

CYABBOTISMS

gracific Ri or APAT, exprise in APAS, gain and Mills, and visioned (Feynmatters and Protection River). It is executed age visit in 29, 282-1833. More granted by the protection and protection and the continues and visit photograph existings. p. 21, p. 23, m. 16, x. j. L. and S. A. (see, Ermidely, 1922, Arm. See Millschool. 36 (22)-649 years the missible in printerly address an existence. In survivoir and continues are address an existence. In survivoir and continues are address an existence. In survivoir and continues are address an existence and continues are address and the continues and the continues are address and the continues and the continues are address and the continues are address.

- In a professor exchanges, the colonies educate educate in colonies (s) is Culifal, C
- To disponent's 30-105-40, CutSi-synemistry in function of promin prohimbarmus, mediated by inhibition of 1006 followers of the memory and 1, 1977, Review, Bayloya, Rev. Comm. 35:173-59, Auto specialistic, 1006-1006 followers (1, 1007-1006). Auto specialistic, 1006-1006 followers (1, 1007-1006). Nation 200-1006, Auto specialistic, 1006-1006 followers (1, 1007-1006). Nation 200-1006, Auto specialistic, 1007-1006, Auto specialistic, 1007-1006, Autor and 1007-1006, Autor
- Thus, the Stilling protein note are organized presents for texted, and the 1980s protein a surman methods. A recordingly, is non-embodiment, when Cotton is seried as a consultary offection wherein, the large Cotton interior or neutrino informate interior is contendorbon or at higher involving on emission of the invention.
- crows or a supera waves such as general reduced. It is consider collectioned of the immediate, and collection of the collection of the individual of the collection of the individual of the immediate distinction of the individual of the immediate distinction of the imme
- The secondary per filtered contributations, the pointing willhorner provided (s)) in all contributions. Chose to DF11 Secondary to the secondary of DF11 Secondary to the secondary of DF11 Secondary weakful. This individual companyones are SF420s and SecOntributes are secondary. DF11 secondaries are secondary of Center of Secondaries and SecOntributes are secondaries of the Secondaries are secondaries. The secondaries are secondaries of the secondaries of Center of Secondaries are secondaries.
- In another preferred embalmans, the primary effector malestee(s) is coolen V (Pagadey, A.P. and Outoga, B. "Artifiched für Sauly big Officies and Their Paradial" in Placedite, a Procedural Approach 1987, ed. By K.O. Handy, Gilven, L. et al. (1980 S. 9) 5373-5394).
- In modern enforciments, the gellency of Recus and control is colorin E2 (a unit online) and the colorin E2 (a unit online) and the colorin similar to CHEE in electric learning on advantages on the characteristic activity, colorin A, E1, B, D, et K, which form fere personality clean in the cuttering a college of the potent motion from a fibe cuttering and in single to will destruct outside it. Validate

31-

intellets proteils. DNA & REYA symbosis; collises of which causes cell objets by allowing the outset is early conseas of this collispecies a \$122 which flactures is a respect sensition to on the Committee of the P3, or proving attentioning a heatening major in protein that falls call or by prompting represents the color from the protein that falls call of by prompting respectation from solute troughest Pyrole AP44 which this col

- respication from South courages; propagative visions and common account and common account and account account
- Automissingly, a primary effector conflictle may compete any beats done described.

 Install of lowers in the est, with the provise that said beats done is and a best after a column. to another specific embedieurs, the primary effector mediculty of the invention are
- tensor inhibitory outry and or furnished beganned these. Promptes of tensor inhibitory outry as to constitute the second of the protone, circusciesco, DNA see, and ghostadate. In a professed embodiment, the postury nificator professite la recibionare.
- The primary efforce molecules of the invention are model, the entertie, to seed, or the processy embodic recommendation of the processing are second, or a margin, or or growned or pricing standard standards tools are commented, reducing, lymphome, or a secondard.

 The inventions promitted models and medicarder according a politicary of the for ambiencie. The invention promitted specific specific processing control of the commented of the processing of
- Transcriber of the available photograph admits alone professional contenting does not extended (s). The inventional provided mouther deal requesting efficiency materials (s) of this reconstitution which has equally failable in a magnitude provided mouther deal requesting efficiency materials (s) of this invention which has equally failable in a magnitude provided or optionally, the endough of confidence of the content of the participate is a managinal requestion of the content of the participate in the managinal requestion of the content of the participate in the managinal requestion of the content of the participate in the managinal requestion of the content of the participate in the managinal requestion of the content of the participate in the participate in
- to the respect of the discrete standings in the problem problem is from that of the debre 119-019 berg paint in foreigh. He herdely, the notice and in from short 199 from paint to short 39,000 have self-in length. More problemly, the number and invited in free paints 20 hours gain to either 100/00 have greater language. Once more preferredly, the number and continued in the 100 have 100 hours and the self-in the problem in the problem. and uniforate to about 26 base pains to about 4000 base pains in fluggly.
 - SECONDARY EFFECTOR MOLECULES FOR CO-EXPRESSION WITH PRIMARY EFFECTOR END. SCULES
- In certain embodiments of the investion, the primary effector methods (e.g. a TNS then ity must iter, a symmetric projects or polypapada, an east-angiograpic factor, or a turnor

inhibitory excesse) as optionally on-superconding absoluted vector with profess conductive, a generatory effector configurate. The secondary effector peakers to provide a children thresponds value and/or facilitying the relation of the commune of the condition in terrial voters (which expertees at least one printers) effective majercule and optimistly one or more autoribey effector antiticides; late the successful comicon meet. As word burels, that water "additional interspensis voltor" indicates that the secondary affector technology provides are

- artiki, u se systemi rike, systemie, or systemie offeni som termer, a.g., je artikiste to that provided by the printerly effecter malemateje). Thus, a recording offenor well-male functions as an additional throughoute System and are related flatter. Perforably, the
- anouncing of finites profusely, whether a thouspectric or release them; (as both), is go profused thy or spootdesity conjusted or explosive at the desired site, i.e., as the site of the type, i.e., in causin controllerant, she associately officers reclaimly our serve two functions, i e promote the robuse of the business coll positions (e.g., by promoting buckerist cell I just or quari tysis) and gravide theory sails value (e.g., by syrotoclarly to the typest codis). In consist acts finishing embediments, the cylotesticity of the secondary affector colorate can
- he endined by the patient's increase systems econology such a secondary allower molecular can function as an increase reduker.

 In contain and advantages of the expension, the anemated busine streams described.
- vector of the investors is engineered as engages at least one ascendary eitheast motocule which has east-ments east-ey, i.e. expression of the encoding eitheast motocule security Spling or building of the growth of a motor or more calls.

 The consulary official methods is produced as a motor of a mo
- markin mid recleanly carried stands remoded or single-exception DDM or drainly-executed or single-executed DDM or drainly-executed or single-executed DDM, or drainly-executed or single-executed DDM, or wall sa nights; markins cold acclosudes. The markins odd stolecule cen function se a pai rapera, et antiques muchés suis, seo.
 Antiques recolousées ses allquancéandées ties bind in a society, especially suis
- to worked acids, north as mANA or DNA. Were a bound as at RNA data has complicationary survivates and have a serious analysis of the mRNA (see, e.g., U.S. From these 5,109,053; 5,190,931; 5,135,917; mak 5,057,637). Triplex scalaoulm refer to ringle Deld strands that blad dealers DNA Compley a collegar triplet tupletale, standy prevending managrica (sta, a.g., U.S. Panne No. 5,176,956).
- A riborgro is an RNA methode that appoint the elector RNA orbitories, much as aRNA, usuality as traditions or insertioness which are growth or expression. These are as load five densery objects of riborgraps involved in the above go need to be price of RNA. cinches. Ribotrystes care be terreted to any EDMA transcript and can established between conscient form, e.g., U.S. Panes No. 5,272,26th U.S. Panes No. 5,141,019; and U.S. Panes
- 76as, 5,166,653, 5,120,818, 5,216,742 ppd 5,593,200).

-41-

PCYCEROLITECT

As described above for the princery efficient mediumle, a unabled sold expending or registing a recording efficient audiente in geomidal in operative Makage with a solicited percurer, and optionally in approprie histogravida other elements that participant in riprion, a anabanco, tecn bearing, probility and for the film. Transco, the second 227 affector profession one became and using the same propriets as the primary affector

probable and an internal viscous binding site, or using a different promoter than the primary effector wedocute. The exclude said restours exceeding the prophetry efficient motorate is fluen about d bate pulsa for above 100,000 hear person a tangel. Prote moby the results in a fact and the free free most a 10 line pulsa for hear person in fact, and the state of free most 20 line pulsa for an 50,000 hear pairs to length. More preferably the state of an activate and the state of the st

preferably, it is a maleix and motivate flour about \$5 pairs to about 4,000 tase pairs fo

es of the official contact is exceeding the secondary of the

real-codes downbard before one wall knowne (non GreeBook). A musicio solid modera lo is according a successfully officere malerells, which becomeny officers replevels in a cyconian or cytopasis factor or a busing poly sector improve, vertext or derivative literal, resy be isolated by everyond sections, across exceptionates (e.g., PCR), probe hydricisement of gotonic or cDNA bireces, artificialy acroming of supression libration obtained by synthetized at obtain at these terremental or effect sources

brackie midweisender zud eligen untsolden fer und zu descelbeit keenen som be symbolized by any method known to store of shift in the set (see, e.g., imperational Publication WO 93/01206, U.S. Prince Nov. 5,249,040; 5,175,260; and 5,169,124). describes on of eligenstated for and throughout the union spice agrees involve matheds well known to the set

SAJ. BACTORS PROVIDENTI ABBITTUNAL THERAPEUTIC VALUE

he pretein embediments of the serventon, the stic cost of trace-largeted besteries recess of the investige, which expresses at tend our paintage affector expirence and in profitability a Chinamphile vector, copresses at heart consecutivity efficience reclarate which 36) Bet arti-turnet entirity, i.e. comprenies of the saton they efficien medicate results in hilling or indictation of the growth of a terror or became only or appeared of sumer only, thereby augmenting to cyluparic or cycanolic action of the pressay efficiely molecule. In one unitediarum, the officia on the ternar of the assembley effector replaced are addition to tions of the primary effector molecule. Its a professol united letter, the effects are septra 35 addition or synonylatio, are product than the gam of the effects of the primary and secondary

DOT STORE

disruption of the cell cycle. Buth a product may act, for example, by elegating skirls as oarokia, mikiring an eleogeting factor, elecving coPCNA, or eller mechanis that reduced pretein apparers in a fewel audients; the said connet convine. Examples of matery effector explorative include descape not binded to aspecie, the ricins, abrie.

tenne intolivating proteins (RIFs).

er mateix and encoding the same, i.e. on encyses that medicines it a stanuted ne of a drug to perfect a systemate agent. Magazine accomplete of pro-drag conve nuryers are fisted an page 25 and in Table 2 of WO 96140235 by Paraelek et al., which is Inamported herela by calegoos, WO 7640227 this service methods for produ secreted fledom postelen compressing much pro-drug conventing manyanes. According to the noting econymise need not be a secureted protein if 40 sa iurandau, á pro-árug trans

- expressed with a saleuse factor pushing ERP (Box, buffe, Section 5.3.2). In a specific dorodian H9CAM 02Ng amoninonya is oungero galterwees garlo-ong art, masaibad which sate upon military cits C and profitment in (bidarray at al., 1994, J. Hannacol, Exp. The appear, 279:645-649). In complete enalth disease, the according officers prolocula (s) in co-expressed with a release factor enchan ISEE, and course the orderest of co. latters (e.g.,
- NADH, NADPE, ATP, stc.) which enhance pro-drog converting enzyme extrusty. In acciding made of the certificial ment, a secretality of looser analysis is no expressed with a when is factor spoth as \$400, that the colores of an activated dang (e.g., a dang which is mativated within the Consocial agenylates as peniglates, and their released flow the Eusterial
- 25 Miles code a parkers (NOS) or est cadestylish make calde syntheses. Nitre codes (NOS) is implicated as he introduced in the preparation of vaccolar growth and in assessments. NO is

od Bern L-orgánine by skula oxida cynhaes (ACS) and anodalasus trans influencery and earth years he responses In gradient earth of the est, the estate large of the town and equal is experient or extra

- 30 to a still by inhibiting the perdunsianest earlying of a protein toward in the prohibition, such seen anappear or grands flows, (e.g., MPGF, lest 2, box-18K-PGF, FGF-5, bas-28FGF-6, PGS-6) or reliable recopper or ligant. The intelligence can be an few level of innecessition or translation (modisted by a recordary offsetor endeated that is a ribertyme or triples. E) (A), or at the level of previous activity (cardesod by a proporting effector medicante that is 35 and inhibition of a provide factor professional, easily as a distributed congestion transport.
 - In paction emirodossos, a occuratory effector undecada in a cytotico, chemokist, or commonocidating payatin or a sected, and excelling the same, much an interiorable- t

STO BUILDE

PCYATRO INDEE

(M.-1), inactivation 2 (M.-1), inactivation 4 (M.-1), forestential 5 (M.-1), interdental 10 (M.-16), interferable-15 (IL-15), inautrable-18 (IL-15), confoliables security a appealing persola 2 (EMAP2), GM-CSF, (FM-y, EPM-a, MIR-3e, SLC, MIP-36, or an MRC as such to Id.A-87. Delivery of each pressummed thinking offertor motocoke will stocke the Septem system, increasing the powerful for best nationary intuition. Abstractively, nucleus sold molecules manding continued many molecules, each as B7.1 and B7.2, Especia the both COOK and CTILA-4, can also be delivered to enhance I cell mediated impre-Yet narries in memorahisting agent in, a-1,3-galoriesyl transistate, where exper numer acids efform complement-expiliated sell killing. Parties, enactor immenses deleting and urbano, i.e. a prolecule specifically that is expressed by a 10 Stored cell and not in the non-emperous conference cell, or is expressed as the near cell as a higher to of these in the are-concerned counterpart cell. Managina examples of represapprolated arregues are described in Kuby, January Logo, W.H. Program and Company. How York, MY, 1" Ectelon (1992), pp. 515-520 which is incorporated by othercom to Outer oranged and accommon pages and progress and laters in to those of while in the est. in another embrodiment, a secondary efficier suplement is a PH-3 ligated or medicic acid excelling the salare. In another embediment, a secondary molecule in BRP, le a specific embodiment, a recordary effector confecule is not a TNF finally quantum when the primary offectur molecule is a TAP. Rackly marrier is a motion up our buildings, a recording effector molecule is not see and on giogeoic factor when the priency effector resiscute is an replumpinguals factor. In sentitor appoints unbodiment, a proceedings and totals in mot a cytotaxia puptide or polypoptide values the sacrodory treatment

53.2 FACTORS THAT PROMOTE THE RELEASE OF ATTI-TUNOR EFFECTOR MOLECULES INTO THE TUNOR EFFECTOR MOLECULES INTO

Ne nection often earlier dismost de the Invention, the Instituted Control-layer of December desire of the Invention, the Admission and Neutron Experts of the Control desire of the Invention of

is a cyclosic pepulat or polypophata. Its startist apocific conbullment, a surrantery analysis is not a terminately facilities, stages when the primary official surfaces to a 4 remin

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N... 9/17/2007

NO BURSH

PCT/CBM/HD241

The criteria factor ray extend by the besterral vector of the investion only by reflections in the modified attended statement between bounds or it wing by the proprises (e.g., complete by a machine and that is and infertor to an insteamed transcorption) attends A soften factor way be consided by a conflict addiscountising a planet, or by a resolution which his instead with a conflict and conflict and conflict and an extending the confliction of the machine of the security story in section of the processing.

- mission factor many the crossolarly give request authors tool or planned to the conducts a primary collected melanolous, only an appears and existing out for primary. A factor factor region of exceedingly the connected on the control of the protocol factor of the control of t
- Professor factor abbors for enhanced release of the factor persons from the soft-termic space.

 In a professor depochamic, such a found is one of the fluctuation belong should provide a Factor of URPS company to the invasions on the first of the fluctuation and the fluctuation of the fluctuation o
- can originate from miley service turnes in the set that selling but not include to third south elbooks. 19 Peril planning, and ori Graditian Highly stategable, or the couldbase, N. et no planning. It is perferred earlichmens, the SRP is of stranger 2019; (SCODE 1) SRP). Concretily, SRP is and S-22 arospic 2018 graph of the see biblioticy synthesismal as personance and original control original segmenters to have seen of the septiment of the personance and original services.
- percented resolvention (ProiSSP) with signal pagaments that are use there exists algorithms. SRP analysis as designs rocke modifical, as beaut to pear, but the disrepantent pagaments means meaning as designs as Ordan, and usually providing which as increased to the distribution of a start membrane algorithmic filter is designated and refer to the contract attention of the Prof., see our
- in the despectation of custom manufacture placesphalistics (EV): general information ISPR's, see over a der Yell or al., 1975. FSEEM Scientific placesphalistics (EV): general information in ISPR's, see over a second second seed of the second secon
- O envertupassed, DRT was cross of the breast data forms to be broaded by the filling for the plant and filling plant and filling plants of complexations of complexations of complex to the plant and filling plants of complex plants of the plants of the
- The state of the properties of the state of
- 25 eyexplannia component is nationed, without beautist jude of substantially all of the hydron. Substantially all of the basteria, as part berein, it store that 10% of the besteria.

45.

WO GUIDAG

PATRICULAR DESCRIPTION OF THE PARTY OF THE P

professibly more than 16%, cose perfectivity 88%, soll more professity more face 90% and most preforably 90-100% of leasures

to a specific anticolorese afabrimentics, the BRP process is a pClaSP13 BRP partiest who he lighter factories has been uncomplied from its provide rejease Placeton, Georges eclassing proving referent referent business basic pass for Wal at at 1, 1976, App. Zav.

biliarchiel 64:392-3985. This embodiment allows for perlonged process articles from the bacterial vocate, while inducing the and the Bequies administration of the execute unather specific crabed issue, An IRP of the inventor is a parallel SRP with a abotivous) C-tensuistas, which is addition to protein primme reseau well bain (Liberalis stell, 1989, J. Stattaciol. 17(c2673-2679).

In seather empediment of the investion, the referenced relays years concepted on conveyopment of a portugueous sea e.g., Buggreens, E. and Nilsodo, M., 1992, S. Dick. Cheen.267/2507-11. In contain on buildings where they're represent by the business vector of the

operations, the BRP day be preference to the report of the section number suggested inspireds). A BRP may be exemited by a section orld comprising a plasmid, or by a method unix which is hit granted into the groupe of the monoment the or-teracted bacteria. A DRP may be seeded by the same models said or glassed that were its a phenoye for our content of our content per content and our or private that exceeds a phenoid A BEP cours be contently officient molecules, or by a sequence analysis acid on pleasand a believe provided a process and the contently officer molecules or by a separate facility and or pleasand. In our one boddeness, the BEP cities and or pleasand. In our one boddeness, the BEP cities are contently or by a separate facility and or pleasand. In our one boddeness, the BEP cities are

suprement is not in Which also copyrights a figure protein conventing as effector motivate first type of the Copy-life protein. In this embeddings, the co-express of the ESP above for collesion of the faster protein.

he a professed specific embodiment of the investors is 550° encoding territor entities each of second by a collisin plantest. In another specific embodiment of the investiga, the SAP annothing muchoic would be empressed and or the contract of the metro 1982 promoter, which is um 80% promoter that supposed to about (e.g., conditions that head to 50% (monage sweet as UV light) in the prompt is not (for BRP, Electrocons also such, yet is purisity contribute 30 In Submarchia in a gardened embaliarest, the SBF executing michia add is expressed under the contact of ske pep?" presents, which is addressed to response to the rescribio nature of the tumor environment (not e.g., Londondo et al., 1997, J. Bacaciel. 179:1909-

Alternatively, the protects can be an excitation ordered precioes, such as the set

promum of the Tu O compage, in a profund embaticate, on in promoter in a singlemer, which are beautisticated in an all-or souling matter to the protected of innergoline or enelogy tier ter test or dougly policy and anky destrinopoline and provides a

KONTAIN A

CACCHOLISM

genetically relate as odd entries. In proction restroducers, the new presents in mellineristant, for exemple forest-pixel. Onch a melliner removaet per a present in security to the presence of the exemption and operation a very supportional years for consisted forms reduced learned. Processor and relative households between the entries, Processor and relative between the processor and the entries. Processor and relative to the entries of the entries of

- Similar in Control (1994). The control of the second of the control of the contro
- in district grow upon not induction when opinishly liabed to the set promoter. An infraince of this processor is that it is included at very law second of testing-time, approximately Little, of the dissipations agreed for auxiliarity activity.

54. DERTVATIVES AND CHARGE

The securities duther reconsequents backets secure that are as section on each of deferred activation, including fater sufficient to the growing section and project section of a project production and the section of the section of

- As the process of the contract, another sage, and the contract is also as the contract of the contract, and the contract is a contract of the contract of the
- to a store overprised or in two over treatment removation occur.

 Any of the prismage or issued per Berman sociologic such that solds fast or of interceibles of digits can be a departed on early southed for the stugs by matters known to the own. The departed code serger to competitive to Countral Decodes his Molecular Richelys.

 Other Erhebalising Associates, Dec., and John Wiley & Soot, Jan. New York, and Zwang of As, 1904. General Sociological Associates, Dec., and John Wiley & Soot, Jan. Marw York, and Zwang of As, 1904. General Sociological Associates and Sociological Asociates and Sociological Associates and Sociological Associates a
- 30 Ocean Publishing Assyctants, Dec., and John Wiley & Soci, Jan. New York, and 25 al., 1991. Gains 100:61-72.
 -47 -

RIO (unida

F/CB#013241

In a spraftle explosione, a differente, males, or vecesor a planet processories. In planet compresses a recommendation designee in the control of the section of the processor exceeding the planet or manufacture and works, or depotent change of the intelligent control of the planet change of the planet

10 over Verdar serve 6.1.1.4.6.d. and 6.1.1.5.3.

Datastroom or extended of Lapidace or contribute different modes and find that and pall find to be one modes of Lapidace or contribute different find and pall find to be one modes on expending explaintable in invitational physical pall and p

soil, e.g. intrives also imposses of the primary efforts motivation to do for 'correscename, the impossion is sufficient for the correscename, the impossion is sufficient for expension of the primary
and the corresponding of the correstandard or corresponding of the corresponding or corresponding of the corresponding or controlled provisions or fore
composed. "Thus are gainteen in the first assessment for composition for the primary and expension of the corresponding or control or corresponding corres

cubications, the tree expenses as the same largely and control delicates, the tree expenses and the accomplished whose terms to the accomplished whose emblooms better application, a control material embloding principle of the moderational application and the same productional principle of the same principle

45.

WDUCKE

COOMINAG

Deal, 255-495-4140, DLAST maximum around so control can be performed with the NSLAST program, posses = 100, septiments—12 to differ accident assignment in orbitage as a restrict cold vesselve as of the control can of the control cold vesselve as of the control can of the control cold vesselve as of the control can of the ca

- the XDL-AST program, names of the well-depths the shalls person next sourcess to translationaries accommodated and translations are shall personal to source the shall be accommodated as the shall be accommodated to the shall be accommodated to shallow distributions. The SSBM 2004, Amendment by Enditors are shall personal or accommodated to account second without demons different accommodated by toward probabilists (AM. When utilities distributions of the shall be accommodated by the shall be accommodated to SLASSO. Copy and SLASSO, and TSB below promposed, the default provinciates of the completion produces the shall be accommodated by the shall be accommodated to SLASSO. Copy and SLASSO accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO. Copy and SLASSO accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO. Copy and SLASSO accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO of the shall be accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO of the shall be accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO of the shall be accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO of the shall be accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO of the shall be accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO of the shall be accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO of the shall be accommodated by the shall be accommodated by the shall be accommodated by the SLASSO of the shall be accommodated by the shall
- pressions ((g., Nouvous servicus) i verse un entre primario de la proposition ((g., Nouvous servicus) i verse un entre primario del problem della del primario del proposition d'incorporate del proposition d
- 5 of an B include ADVANCS and ADAM are Charched in Tweedile and Rachott, 1994, Comput. Appl. 8050s. m. 1975, and RockTo. Advanched in Presson and Ligenos. 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. 25720464. William HATVI, Rapp in a count opinior than such the servicining and spart of the carest. Ethap 2, single-spices in the two sequences in sing companior. are found by booking a paint of oliginal resultant, 1750s. 1, single-shipped months.
- See consecuted thing case to set to 2 or 1 for protein sequences, or from 1 to 6 for ONA proposedor. This default of king is not specified to 2 for proteins and 6 for DNA. For a facility decorption of PASTA parameters, are introduced to a serve of the Company o
- 25 treseponned berein by reference.
- Aftermediaty, possion sequence alignment may be consided out wring the CLUSTAL W algorithm, as described by Higgins of al., 1994, his made Europeal, 264,020-00.

 The second Membry between two compences can be determined oning techniques.
- The passest Methig between two expenses can be determined using tearniques

 so similar to district database with an observe observe observe gape. In embalating paramat
 identity, only on the summing occurrent.

 A pressary effector motioning or a geometry observe motionist, or derivatives, or
- amings derived cash be produced by reference medicals for you to be as. The incompositions which must in their production amounter as the number as id or you to be as. The incomposition which must in their production amounters as the number as id or you to be as. The incomposition which must in their production amounters as the number of the first or production forced. For example, as of the cash of the production of the control of the production of the prod
- Sunhacele can be medical by sep of sunecess mesages brown in the an (Suphrenk or ol., 1969, Melocular Closing, & Leberatory Mesant, 2d od., Colé Sydng, Einhor Laboratory

. .

AD ON DE

PC9/0890/03241

Press. Dalid Syring Hartmy, Flow York). The requested can be observed an appropriate record with contribution entire sectionarity, intelligentably after some presenter and distribution of Control, and schools, and Equino News. Their generations of a required school controlling a desirabilism or suiting of a principle or association gradient entirely control and an about so some data for an observed distribution produced an entirely generation association for control musculational mediag, Centrol and the suitable production, publication, publication and control professional and administration of the control of the

In the officeto moderable encoding an quance region where the deviced primary or according officete positionic and only in annotate.
Additionally, a region or dispussment encoding on efficient recipies and be constant.

to video or six tries, to create and for dealing received on, initiations, and an expectation and personal or to remote contributes in cooling inspirate analysis to damn may experience and constitutes after our of security proceduring once, and procedure for the small procedure. In procedural specific authoritiests, and effective contributes conclude and dealers to the procedural specific authoritiests, and effective contributes concluding sources to discourants to the contribute of the contributes of the contribute

a professional specific eschedulestas, see effective conductate, exception to the celebrate of contents, for exception, to engenties at the proposal exception and buildings of a management for the celebrate or the celebrate of the celebrate of the celebrate of celebrate of the celebrate of solders (Phanamach), FCCI, while followers communities are substance, see the pre-information solders (Phanamach), FCCI, while followers communities are substance, see the pre-information solders (Phanamach), FCCI, while followers communities are substance, see the pre-information solders (Phanamach), FCCI, while followers communities are substance, see the pre-information solders (Phanamach), FCCI, while followers communities are substance of the pre-information solders (Phanamach).

Sident (Pharmack), PCM with Extense consuming a members, etc. he a prior real exclude disease, exercivedre under self antibulativity and extend etc. on consistent exceptional surspective tradition total consistent of the efficience instance. "Promone risk antibusación extensional consistent de la consistent transportation with a missimilaring. Exception de distancion acuté consistent la resistent production de la consistent d

de debits unh kitalitar khotgan hovo bitara fatfored hi Russi. Those Statistas sociatis animo accide mais consistent sociatis des debitars (e.g., l'estina, aguatina, instructora), actido tide crisina (e.g., animosa consistente estina (e.g., alle planta estita, visale planta debit animosa (e.g., alle planta propriato, administratora, accidente, inproduce, eperitaris, accidente, indrinde estita (e.g., alle tides estitate), lascon estitates lascon (e.g., indrinde estitate).
Lascon estitates lascon (e.g., indrinde estitate) (e.g., indrinde estitate) (e.g., indrinde estitate).

de chaine (.e.g., havailes, valins, andressins) met present hait chaine (e.g., specimen, hibotychiales, trapping laine chaine, la factoriales chaines, and the chaines (e.g., specimen, hibotychiales), trapping laine chaines, and control factoriales chaines, and control factoriales chaines, and the present chaines c

this general cent be determined.

In other period Secreta, the efficient makes state furtion provides of the law access we constituted to consum a provides always size.

5% BUSION PROFILED

In certain crainfollments, the famous provides a person y or secunitry effector as though which is constrained as a fanism paction (e.g., covalently localed to a different

-28-

P/D 0LASSES

PCOCOSSIDAR contring Increases

protect). The investmen provides analysis stabilist excepting such finalise provides. In containcibles emissively control of this inventions, who are offer enouting a finitest provide of the invention in control is little to an analysis in provides. The appendix materials are continued as a chimmic or

- Softhing protein companying an extigator materials on frequent interest (perhapsity constituting of all learns at death or most of the softhing of the protein of the protein proteins of the soft of the soft interest (as a first soft of the soft interest (as a first soft of the soft interest interest (as a first soft of the softhing or construction) and a protein constitution of the soft interest (as a first soft interest interest interest interest interest interest interest interest (as a first soft interest in
- Betterdagous pubpupution or frequent bassed that is faculturally active its corresponding purpose of the contraction of the con
- To expension with a find the management amount for the different factors of the management of the management amount for the different factors of the management factor of the management factors of the
- 20 cmt colorinat refilitit sin e civita rate prosets conquising e dispersion of a primary sur uncontany efficient mathematic of all fairs for all legal for a shares 22, as feat 60, or at feat 100 arrives action, at a Congression than displays one on ensem throughout primary or those field designly one on ensem through controllers of the field designly primary or information of the field designly primary or information of the field designly.
- The expectific embeddenses, a forline protein comprises the efficiety signated in a bound in filter of the protein form of the protein for the protein for the protein filter of the protein filter of the protein contract of
- shack is soften with a lost of a major is constructed stars is distant potential of the intensities. In private restand design, an efficiation conductable is constructed to use using potential and an experiment in an experimental properties of the construction of the compounts, professional properties of the compounts, professional properties of constructions of constructions
- 36 La a performad espécialisaçõe, que efficient methéride (princing ou sousselany) of vice inscrution (a supressoul se a finales penales with an enter membrane protein (Outpulles protein). Bertos(a) quite instrutirates proteins are marquel anominante proteins of the

٠50٠

PCY/7790(3324) ace, prosess multiple moreburns praying domains and our offst barregist autor comés structed to one or stone light modelles. Quite merabane peoples our initially expressed in de the mentioner in the company to any problem of the problem of the tendency of the problem of for cureus present. In one embodisment, an effector replante is compressed as a ferior

- The substance provens, so were quint contenting an employer, product the discontinuous as a finished provision with an Ormo-like, provision is to discontinuous data province and contentinuous delivery as the content to interface of the formation. Without intending to be first long as to enterlaution, the Comp-like protect in the finished play the devertage to tax as an author or tother for the efficient sustantial to the color mensiones, or curves to lecalize the problem to the bestudied owns notationess became exhaultions; the findouseffor obtains made with a se
- Compalities per table in user of a ventioner herodicalities of an effector molecular as the periodicary.

 By anything a stabilities of the periodicary of an effector molecular to the Despitation for the Samuel Sa to eximute relates of an efficient protection. In specific text originate, the Outp-like protein in at Italia portion of Outp-like, Outpl., Outpl., Outp., Outp., Outp., Outp., Outp., Outp., Outp., Outp., operins like probin, Flori, PhoB, IroB, A-bourness, an enternouse, prakin A. enfogiace 15 Equivalence resculed Spageroria (PAL), PepA, Plans, NorpA, NorpB, HospC, or a
- imples contact interdirects in personal (such as LPP), etc. In certain authorises of the in certain, the signal magazine in contamination in such invitamental (e.g., by the base or replacement of a mino acids within the signal sequence to inviron both a reduce trials, e.g., instance, As Watterfree exemples, are Seebens 73-7-4, when
- In other embediancus of the invention, a finite premie of the levestion exception narrowsky do cleavage clas. The probabile elegangemies may be code; come to the effect enclosed to confinguation to the Compilline profitie, or the profession of entrope life may be opportunited into the States projects. In octain approxime endocrates it, the Compilline process of the acreation is a Lehkoid Corp computating envisored elevateds that colprate from
- In an extension of the enterfaces, the Omphike possis is Omphic personages and to the consecution of Omphic Blo finites proving the splitted to other Omphical States and to the consecution of Omphic Bloom proving the splitted for other Omphical States are taken by the other Omphical States are taken by the other Omphical States and the other Omphical States are taken to be of the specific Omphical States and the other Omphical States are taken to be of the specific Omphical States and the other Omphical States
- For example, the motion CompA protein consider eight smit qualific treatment better in-stands within the FTO entire sold N-assumal demain of the protein. Better as much pair of transmissions domains in an enhancibility or improvium herp, depending on the direction of interiors of the transmissions denote. The C-terminal domain consists of E56 extino acids which are leasted intravellularly and presentably contect the
- 35 Belligitäliketti ocetikisi ipa intaligament about gehennina kentan pone pone dana. per interpretation of the production of Couple, Businesses and the facilities the generation of Couple, Businesses for country for country for for the period of the Couple for the Second 84:255-2621 here developed vectors containing the One-A agree senting

PED OUTSE

CONTRACTORS

grave with linkers is regred within the proposers exceeding the skind or front extracellation

- turns that ellow the in-dense inpention of the beter obegins promis of choice.

 In one tempostance of the invention, the person of the Oppo A fracts pretein as seeing the primary effector reclaude fran entensed engages in the periodism. So the
- no measuring the gricourty effector rechnoring than enforced engaces in the terripitate. In othe support of the controllment, the fluid graphic controllment of the fluid graphic controllment of the reference for the support of the controllment of the support of the signal supports of the signal supports followed by as best one opening to the signal control of
- Oppo, Nocool Neuropielo in Replany efficient anticolo. The rigid or grows in Copyol, and the refer the institute owner is muther to place of the anticologistics. On persony efficient nationals in the Pri-Internation of the Copyol, Indion, render institute, quantity of the privilet log of the privately well for Copyol, Indion, render institute, quantity of personal region of the privilet in the confidence of the copyol of the personal providing described (Copyol Walland), as long as the facility privilet in privilet. In 19.
- ge uterafinente repending dominis of Ough, Milling finan, a trong as the follow preside is article. In Programmer of the Sendon president of the Sendon service of the Sendon
- titizate of the effector analysis from the business of il.
- In another each ofference of the invention, the protice of the Gaspia flatter protein containing for princing efficient code-calls for the contracting for princing efficient code-calls for the contracting the contraction of the conditional, the discing protein comparison are seen unable for or gold employed on support of the contraction are seen unable or gold employed and principal contractions are precisely document of the principal document of the principal of the contraction of the principal contract
- 30 smissible. In a reading any con of the embeddinated, the promise of fronter problem is a planted persons one cursos debin tooks of Chapts for programming to the nature cell by the hosterial persons are cursos as the control of the control o
- demental Traffigalierand, comprésas a une possessendriama la specia prosens (figur a relación apparato (laurel se a susualment emper funcionembrane expassion). As archites escueption places la lei demonstrativo presentant an are presentent destron especial place superator. Such placement have ples constructed to comprése a procision anno acces software constructed (see destructed on comprése a procision anno descouling como traces software institutation (see destructed on comprése a procision anno acces software constructed (see destructed on comprése de procision anno participation de la comprése destruction de la comprése destruction de la comprése de la comprése
- 39 Optionally, so official residents is preceded to this bed by concessor of sample size for an example; recessor or indee presents of that is promoted in terms. No relation of the efforce residents by the of the end-conference. Without the printings of their residents all promoted or feeded by positions clarings intent opposition whether it is bound demokably to be branched by the finding printing regordings.
- 35 Similar flation proteins may be communicative any of the Coxy-like proteins using the strategies described above in forms of OceaR. In the construction of such furion proteins, so will be appreced to one of continuous skill in the set, the extension of the parties

. 53 -

of the One- the protein to be figure to as effective molecule will depend upon the became tion is derived for the expression of the effector motorale (e.g., programmic, extent their, currences despuis etc.). Such region puredo construcione as described barrin de princary effector medicarios are uso appropriate for monadary effector molecules. In a preferred embodiement, an effector probabile in threat so a four problet. Four

- prepares sout to fraken proteins have bett starte to feeligine the dislowy of a polypeptide er populais of intenser to victually any orit within elifention limits of its production on language (yea, e.g., Bayley, 1959, Neuron Bissoy) realogy 17:1006-1857; Fernandez es at., 1998, Marier Bloimbrouger 10:415-420; and Dosoni et al., 1998, Treats Cell Birk.
 \$56-579. Accordingly, engineering attended to be supplied betterfol to supplied to the control of th
- corror). Anterendigity, segmenting attentions interview propose or refered to explain or specific consequent or set of the profession complaining in their populotic and a self-electron anterest installation of the self-electron modes are but instead interview parameters confer to a septicific enthicidiscon, attenuated attacks empty, the but existing a very conference of the conference of
- costs direct, at consisted becare Augusta's bacteries are originoscod as express use or man-12 Medicyn retty metjesstyre endergiell one et alloue genera huspipe en albeigiell it gatal hoboge. and so efficient misses let. In according one to make means present according to their propositions and so effects of finishes a sound on efficient misses the original means to entire mechanishes and be applicably or secondary officers produced. Graenufes of firsty propriets sucharia, but ace and Shalled to, populates durined from the MIV TAS protein, the assertanged in
- bernootsessin (prantratis), Keposi Plankias growth factor (FOP) recommon ment brothing 20 Sequence (647 5), irrepressingular water VP22, polybigadine (e.g., beautifulding old), cololysias (e.g., bergelseine; 6K), and polyanghams (e.g., because inine; 68) (see, e.g.,
- poryporate (s.g., hostogenes, ext., perchaptive globate (s.g., bloassignists, 63) (cost., e.g., blobs) and (s.f.). By the cells. And (s.f.) (s.f.) 89-317-94473.

 Blobs on al., 1978, the cells. And (s.f.) (s.f.) 89-317-94473.

 In particular due deflores, cells. And (s.f.) (s.f.) 89-317-94473.

 In particular due deflores conductes, in a quality and cell duel embodisment, americand becomes uponed between sen supplies of sequences or ments and delay designed, americand becomes uponed between sen supplies of sequences or ments and delay designed and embodisment of the conducted between sent and delay of the conducted sequences or ments and delay of the delay of the conducted sequences of the
- stoodary officers and tooler. la accusar professor o unbedirecata a litellar generia comprises a signal papelde, a
- 39 protolytic cleavage sain, a flexty poposit and an official mulicipals so a sofial terror by assessment teasur-surgered incremin. In a appell's gradualisator, personaled teasur-surgered bickeric are comparated in express one or more makels sold traditioner enoughing one or more decision premises comparates or report enqueror, a possible to therefore the repostude and en effection respectation insurestational with this emberieures, the effection
- 36 atoposia met grantum et escongela egenen mescolar Dy way of non-limiting example, colicin activity may be relacted by addition of internalizing parties defined from MV TAT, heapen simplex virts VVII, resonanteeds.

PETERMINA

GH, 6K, and 6R. The diction can be either Committee, N. tayminst, or satemat. Immed. furious are expecially professed whose the Station follows the M-sensional eigent sequence rage popties. The finises protein stay Sether contigues to 14-terminal signal orquesco such Corps, etc. Contribut signed sequence such as bigs. in a positional evaluationaries, an efficient sectionals in placed to the delivery position of

- a resen. Various testion are impose to know and delivery expensity, where upo pomics of the mouth scales a distinuty agons the the second purity of the toxin. For exceptin, Bulliof or al., 1595, Proc. Hart. Area. Sot. USA 95:1738-12534 demonstrated that the arthrox proceeding regard (PA) which can Easte the entry of fabric (EA) and control factor fator for characteristic fator characteristic control factor fator fator fator fator characteristic control fator f
- preceive furnisher to a transcated florate of LP (Life: 2.15 service sheld enrichment). These, efficient molecules of the injuriese, sucrept florar later function countries the cell, care to fund to the). Fry, or other topic pystoms, including, but limited to, dipheria up in A chain natidoes is 193 (Dienke er al., 1996, Proc. Mail. Scad. Sci. USA 93:5-D7-8412), cholore toxin. veretosin, & esti best labile makes (LTs), & oulf best strible seeing (STs), settre-
- regroups, a cert near mome manua (1.18), a cent recurs are more (1.81), course mome (1.81), course mome (1.81), course moments, evaluation (1.81), (1. Nickewier Berlings, Nielchneis et al. (edit), Astal Peres, Washington, D.C., 1927/88-28612). In a specific controllesses, a pricency officeur tealerate in favor to the delevery portion of a and passers to recognize the conjustion of the recognization of the contract o
- dictivary port topics of a topics.

Communities of fluoro proteins for expuspion in leader's act well brown in the set and such people of one within the scope of the invention. (See, e.g., Michaiste, S., 1996, Milendelle, Re a 60512-558 which is incorporated bends by reference in its maintay).

S.A. REPRESENCE VALUE CLAR The present bardeling provides attended former respect features within how from

ered to excels one or more primary effector multipoles and optionally, our or some geocratery affector molecules. The impector provides attenuated towards cycle-fibrosomic 30 enterprising effector anothersis (n) which are exceeded by a phomist or manufactable asserted and. In a proformed embodiation of the insteache, the witnessed support togethed insteach in

- Solvenskie. When uses that are effecter malerale (e.g., primary as recottenglic approach in an encrossed practice approach to the affective malerale, such as Solvense Re, the affective replexules any he enterthal by the tence planning or mutate noist, or by worse than one
 planning or number said anaboule. The in-matter also provides see available transportagement
 hereign completing of feeting indisordally which we conclude by a models and insulative
- solida is hergensed lato the hecteriol gamme. Emegrated officers molecula(s) way to

. 55.

PERMIT nd Buscon gargeted block rise, much as Sobroverila, or may be send in the extension terms are presented between Gr.g., by iteraduction of a mutain sold takich egyodes the offictor melectale, such as a physicia, town factable particle, sold, grangersus, etc.) such that the metally sold seclected proceeding the effector mode becomes integrated that the granes of the absoluted trainer-angeled by, . 4. To a professed a total discuss of the invention, the attenuated action-angeled between a si

- Schroude. The invention provides a suctore acid assistative exceeding as officer as which purish sold is operably liabules so appropriate protector. A proceeder operably his and a manufactured produced to a constant of the constant
- The marked life sequence coding for an effector mule cate of the levolation or a terretionally active analog or frequent or other declyation (hereof, can be insected into an appropriate expression vehicle, e.g., a glasmid which must be the necessary elements for appropriate expression and manufacture of the insented profess on Wag steparton. The necessary beautiful to and translational signatures be explained by the official molecules and/or as fluciarig regions. Alextrastively, an expensation vehicle is constructed by inverting a expectabl IDMA requestor recording a desired protein together with unlettle translation initiation and remainshing signate in operable reading pheer with a functional prostation
- tuding one of a variety of makeds leaves in the set for the exemption of DNA. Res, generally, Suchrosk as al., 1999, Mohander Makeyer. A Laboratory Miserat. Codd Spil Horbor Press, Cold Spileg Nation, NY: Auspitel et al., 1995, Current Protection. Melecular Mulago, Orean Publishing, New York, NY. These medicularisay metabala 1884 promphisms DPA, and symbolic metaliques and in who promphisms (genetic second-maior). The treation provides a mathete acid molecule occuring on effer particule outsit mately acid is openibly lighted to manage speciate potentiar.
- The protect investion also prevales assessated sector-temporal become which is bee, modified to exceed our or recording powers and optionally, one or work officier teacherships. The investigate provides are marked transported but term quapricing fluids: provides educit are on reded by a planned or agentivestible reaction said. When more than two finish protein shote effector molecule (e.g., princy or updately) is expressed in a plan observed terror-imposed baseds, pack as Safrondelle, so Reide evolution makes therein sucherates any, he muo find by the same playing or nucleic zold, or by more than que played for rangele zold. The levention of approvider attracted are unsured besettle
- comprising flation proteins which we encoded by a reach it and Kosch, is subgrated into the historial generat. The investors ofto propriate a provide soil profession excellent in finite provide which accluse acid profession is epecably finited to an agreeystate promoter. The necleotide expanses coding for a finite protein of the investor can be incomfisted on

- 36 -

Set Court and

appropriate expension vehicle, e.g., a plannid which conserve as secreary elements for the resemble and masketin of the formation of the forma

to certain as roller unit officers of the leventon, the expression vericle of the investments aphaemid. Lengt purchase of testadist planning are known to those of while in the set and are colorate rolling resolute for greening the recentivent constructs of the 5 Present invention.

Such communical photolica isolado, for example, pKEC223-2 (Photomple Pine An command of periodic bonders, for examples, pol. LLEAS of transports in the Chromatol, Equipment, bonders bonders, for examples, pol. LLEAS of transports in the Chromatol, Equipment, bonders, W. (LLEAS, Tour pRESIZE 'studieses' actions are conditioned whether any expressive procures and the assumed appears to be our periodic procured. (LREAS EXECUTION AND ADMINISTRATION ADMINISTRATION AND ADMINISTRATION ADMINISTRATION AND ADMINISTRATION ADMINISTRATION AND ADMINISTRATION AND ADMINISTRATION ADMINISTRATION AND ADMINISTRATION ADMINISTRATION AND ADMINISTRATION ADM

pUCTY (AV e.g., Yardisch-Perrow et al. 1965, Gran 33: 103-119) and pShancrips (Уимарске).

The fellowing planeles are provided by your of example and may be used to acquisition with the markets of the torquition. Secretals, planelessing, planeless polococara S.K. pile K.S. piricise, prifilise, profilie, prifilise, prifilise pRRS22 "technore" may sten be west, for example, pRR213-3 (Plantecia Pior Chemicals, Upperly, Swiden) and CRM I (Province Biotre, Misidane, Wt. USA). Those

29 no creditard with an appropriate protects and the constant) respective to be expressed, pCRT, pTS (or described in Section 4 beneats). In appentic control course of the interestion, a physical according an officer student is the pTS-TNP-n players, the pTS-ERP placeted, or the pTS-ERP PSF-n playered as

dentified in Status 6 homin. Sea agazific embediences of the correction, the feelest protein of the inversion for

As a partie on trachmonal of the surresion, the risking provise of the interesting the succession to the partie and grows a game of course, and a provision of the surresion to succession to the succession of the surresion of the surresion of the surresion of the surresion of conference could be in exact legal of the surresion of the Surresion of the Surresion of conference could be surresionable to the surresion of the Surresion of the Surresion of the Surresion of conference, the later and surface processing of a Sufferior couple final vector is implement by a grift or in procuration (see Treesmonth Surresion and 1998), Nov. 1667-1679. The Surface grift of the procuration (see Treesmonth) surresion and 1998, Nov. 1667-1679.

The process revenient also provides transposon resultated vice measured integration of officers readened. Any recomposon pleased known in the set may be used in the configuration of the investion or tray in the second of the investion or tray in a transfer with uncertaing as efficient professive case for

contracted into the tempora-a causette. For example, the inventoe, provide a temporare plantid, comprising a memporare at medianaposes, and an IACS.

- 57 -

PETROMODIA

nom species planeaid, i e., ecosyrises a transpasson in which the proposed ascerbing an effector medicale of coreses is interest. Transposes placerels cruzies exception carried which sessons becomes integrated into Gorbottered genous. Ascerdingly, a models sold especialists and effection to obscude on funions projection there as it incomes become management cassocie. Thus, a transposon entertion integering the cassotic less the becomes growth. The ording concern of the effector molecule can be opening lighted to a province, or can be promoterized. In the better case, empression of the scinestive rearder in driven by a promoter of the electof transposes investige total the benefits governor. Colories of box Larges a transposes investige are accessed the appropriate functional the topularismust of the investion, e.g. that express publishers levels of eyestine to previous turner systemistry, statis, or regusation.

и солите строобитель, імейлійного биз технеровно, бы в инприлог разпой examples on, exceeds the leverted reports of the management, a transpose or go so to extend on the Insert on of the transposes was the besterial garage without being carried along with the

- 15 interspectes, to that incurring statics with stable transports insertious are generated. Transposes to be sufficed by the goodest investible archite but are not limited to Tol., Tel., Valuent XVI. he a preferred confedence, the companies planted is physically (ATCC) having an amphiblin mahature game because outside the Tell timestics electeds and the models acids counting one or many effector englacets) is incomed between the 20 two Tall Specifics six average (e.g., welless the correspond constitut). Preferably, the
- operations in made small that all indicate programmes countling other elements is interest lactwood the two To 10 insertion elements. In appoil to enthedite eath, such elements may agriculty include (1) a promototiese edgy a schemble earlier (e.g., SecC, Arus, etc) for pendine solution of this letter is containing the plaunit; (2) a SRP grav. (3) a promote for the effector intelessing (such as no) apports by finished to the medicine as in econology the true or more primary effector musicousle(s) (much as TMP-as, or a funisher protein filtered, e.g., an OmpA/TMP-is finished; (4) a terrelineary thy the applicate acid enoughing the one or more
- cilicotor recyclessate(n). No once embodisseed, after the encurpulation of the pleasand an appropriate and
- 30 solocace of tissue of some harring the desired occurrent using the applicities reviewed properties promited by the planning the small-loade reduction is reserved through yourself ton. and status for tag a chromosomer was temperature and the see the same for a the initial seeing to be train subjects (e.g., by planets; on selective modes).
- In mother specific each of imous, the plantail offs at usual which comprises an litered magas operationly from spectors good and a ministratory son, contributed the coding зацилися би о рименскийся лег С домя либая МСБ. То римбы преобо подобителя, бы planted pTS-BRP is used which congrises no aftered segat specificity series core gove

dess serCycus, ead

and a reinforcement in , containing the coding responses for a parent adeptating agent-industries betterforten release factor, and an MCS.

La a professo certa Gastas, a manapatra placald for relocit and absolute and integrants, respective

- a histoparama gasar, for aumorusos excisico and histopathia, located of the transposed impation areasesso (e.g., ombide of the transposed
- b) a mRC-type coding sequence construction to the relation gase delete the backmist state (e.g., sect) at wellow a thought binding site and
 - sentioners for the wild type grow, has leading a programs. This sequence is great mady boosted beamed safely following the link TNI is among too be sention
- 10 apprinted: ogstonelly, burseyou she siggle and led interpret sequences is a mechan sold
 - enquence canoding a release exhauring number and (e.g., PRF); and a multiple change size (ACCS) leased between the right and left serve requirences, contributing unique systetistics alone within the pleasant, for the incorporation of efficient materials. The MCS is predoubly located
- formediately following the solution columning specials said (af used) and just palor to also right THTIO insension exquirace. In suction authoritizant, the gene disruption residing from random integration of
- ice problemière como n'ar languchemenopeme, ideoprice des suimbility of the gase Counten for efficient insection.
- la yet sandtur enfordèment, the expussione vehicle is an exami Dur't mebbe willesst requiring mobilicale assection, da, in quil-maigrabunt. In ann acu-
- that is stable of those comparing arrivation selection, i.e., it satisfies account of a measure-perinting resemple, the north-constrained appropriate would be in Editoration formitation planning. For example, in one calculations of the increasing, the planning and relation systems in animalized by providing a furnishment of the increasing the action remaining that and an the trade of include latters Schizenball burding the Generals can be submired for it the responsa-tion to the contraction of the comparison of the contraction can be submired for it the responsaof faces that do not. In our resignations, the Schoolski of the lavernics is an exe-representation and the expression planning provides the nature or observable provides.
- 30 cargone franction. The Softwarelite which exceeds the expression placed our be referred for by growing the colls on growth surface which lates the sesting that only the desired. cells, we show with the supression planning construction in a hejdy problem aspect of this crobodies on, the Salumenta of the mountain has an obligatory organizated the DAP (mean-densition frontile seed), most professibly by deletion of the not gree. DAP is a component of the papelooghous present in the postplaces of Granz-sequence business, which
- is constant for the wineprity of the business of outer mankings. Assumes of DAF stants to bacterial safe has resulting spot the bas of sour receiving spot the bas

.59.

900 01205292

PKY47340133243 saganeur merialdalydo ordynangeneur) gene erronne ar encyrec in die DAP einsyndiesie

professory. Course as grather to closely which make used manuface can be grown by regarding DAP to the solution species. Planning up, the exponential planning of the investor, that carry the artigues sequence operably listed to a housebooks or investogous president can be selected for by pre-cong Connecting Connection have in that lack and activity in the electron of DAP (not, e.g., U.S. Posest No. S.RHG, 483 to Carries, TH).

- Other new-est blook; selection systems are two my lates are and one within the except of the byoptice. For example, a echodica system willining a physical comprising a steble tords and less stable easi-latin may be resed to neter for because which makes to such a
- is another text-descent, the expression velocie is an expression extensional plumpful that is extensible by necessiblish excess, the example a calletin plumble. As used beerin, a colicio plane di misempily succeito a colicio rado and an anti-colico, she colicio sorte being rease cretin steen the and existing, much than my bacteria which leave the cultifin placerid is killed as a reask of the predagment of the college to eig. In a preferred oppediment, the collicium to in lands large natural of Collid and the analysis in the small exhanit of CodE3.
- to other controllments of the laveragine, the expensive, which has A vector, and appealing a type of the A vector. The preferred endoctioned, the broaded have comprising the A vector further comprises a temperature-constitute A representation in the controllment and the controllmen 39 Sen'C best act 37°C. Connequently, the heaterial beat can be grown and managed to sho
- of 10.,C an post cubic septement up the beginning margine secrecisms enjoyens to special special section (he torde to the bacterial cell. Upon introduction of the batterial strein into the cultiple, the A regressor is least or mad by messed body employeem and expression of the pressay. offictor makessis, was optionally a successive officials residently, is activated.

 Expension of a models acid copyring consuling an effector projection of finding
- protein may to suggisme by a special multius acid suspense so that the effects) malereds is expressed in a bacteria crassitation with the successioned in a bacteria crassitation with the successioned in the multius Rev suspense. exposition of an efficient number is may be equated by may require statement of record in the set. A proposed techniques may be beyoning our (i.e., seriose) or branchapous (Lp., sol major). Prosecuts which may be used to control the represents of an effection
- molecula, e.g. a cytokitza, or History proteks in decresic include, but are not thereby to probayed position such as the \$\Bartiman princes (Villa demand is al., 1978.

 Prof. 168, Acid. 50), U.S.A. 755727-9734], or the inc promoter (Orders et al., 1943. Proc. 19th, Area, Sci. U.S.A. 80211292, Stientisk Souriesa, 1980, 1980, 1981, Area, Sci. U.S.A. 80211292, Stientisk Souriesa, 1980, 1981/1981, U.S.A. 80211292, Stientisk Souriesa, 1980, 1981/1981, U.S. 80210, 1981/1981,
- MATO, STRANCE, SOLAL, OFE, GEO, ENGINEER (SOE, S. S. Schmar et al., 199). Biochimic 19:423-

WE GUIDEN

PCYVISHOUSEE

431.) By a preferred emberhapen, the prescriber in two, (note, n.g., Amount or of, 1982. Cook 60:301-13).
5. a particular embediessen, in which the primary of facility and should it a collection representation the control of a SEEL-emporative processing the measured function.

- may be traject with n-rept, whromples radiction, an abytering repeat or another BOLA,
 demaying agree much and expression of the collects in increased. Exemplery
 STG-construction represents include, but one and invited in read, state, area, client, area.
- SCG-suspensive presented include, but see not liquidaded, record, stills, noted, rises, 70%, seeds, week, words, orall, local, one, east, rook, the large problems of acceptance and colored and orall process.
- convicuosal, for example, processor destina de selement by the concepts or preferences of the follower orth an eller play oppose or destinage plane, Authorisat hand by the Play oppose or destinage plane, Authorisat hand by Playsones of the 16th of the 16th of 16
- 200 Manual de disputation institutation can be as auditorich-destination promotes that and institutation of the Tail Biologicopous, il as aproduced displacement of the Tail Biologicopous, il be aproduced displacement of the manual control of the company described. Promotes auditoric would drop the instituted by an excludent of the company described for company described and the company described and the company described and the company described and the promotes of the company described and the promotes of the company described and the company described and the promotes of the company described and the company described and the promotes of the company described and the company describ
- 25 million provincial for entangentic systems such as Soldsamonthaumyces powrholfer yearned such as Soldsamonthaumyces powrholfer gaze and Garr, 1950. Quirou Granulou, 2016-1079 and manuralise celle (Lang, and Februggield, 1994, Goly 108/109-107), recent amilion manuralise aprille (Lang, and Caller, Ever entangely, Wilger and C. (1999, Gonz 2018/24-132) James shown 0.0-feld in stration.
- of the feetly beginning goes again to indication about operating little to the expression. In the feetly beginning and the present to the set of the expression and the procession in that is be induced as very low look of the expression.

 An elementage of this procession in that is be induced as very low look of the expression.

 An elementage of this process is that is be induced as very low look of the expression.
- Contral phenoid in constructed competiting an effector reviews for or force presents in introduced lates the streamford nation-engoing becomes, efficient reviews are presente or of entition protein contractions and the supposition proportion of them in the rest Underland, but and Builded to be beinglished private, suppose engoing. Needland toke analysis, and Venerum this supposition, force described one as, 1956 and englished analysis, or followed the Manager Could suppose the supposition of the s

65 -

Whiteday

ectation nav Spring Flatbur Press, Cold Specing Harises, 1975 Associated at 1, 1995, Coursest Protocolts as Molecular Shough Ground Probabling, New York, NY).

5.7. COMMUNATION THERAPY

with other known canner thereputs to cost a solid career retries. Its section other embodiments, attenues and tempor-magalad backer's anginessed so express out of serve america solid madecules empeding one or more effector authorates easilier facions publics are used to conjugation with other known concer throughts to from a solid concer become. For transple, assessment transm-vargered between engineered to experts one or more marbels until majeculas escouling can or more effectar antioculas unalter funica proteiro can be used in ction; with a character/speudo agent. Hips ropins of characters pouts agents include,

the are not limbed to, cirplain, the hollestic, moved such as need and participal, topoleometate 1 habitistics (e.g., CPT-11, repotent, 9-AC, and OC-211), percentiles. manachine, exchange, 5-ference of (5-FII), brookers, manalitat, texasid, ukalesia B, granicidia D, ensern, esturuycis, esopoliče, erropoliče, recorister,

15 vichlasine, coldinan, darantirin, damenblata, ditributy antirini disse. minocomirano, minima regicio, accionazyola D, 4-dabyrhotovo storaso, glorocordicalda, processor, in the events, little colors, purpose to the processor, and covered as a supercolors, asserted as the colors of the c and materializa recording the of these efficient molecules endor fution proteins are to be n enviginantien with redistrict shroupy (e.g., gamera picturien or y-way redistrict). Any

reclation through protoces can be used depending upon the type of capter to be treated. For example, but not by way of Borbolico, a yay spication can be admix inner; as poster high-rungy megarotings (anticion of greens that I high sunspy) can be used the door surson, and character from and articorollage x-ray radiation can be send for also passen. grada sky otnikijny variostopnojnoj, proto as radioacedra isompos ad radious, oblošt prodoštat

eloneum near also be administrate as expens tissues to retief its.

The process is unainee implicable that suggestable or excovariation solve in greating of the and-context agent and attenues at some targeted become. The investigation excovariance is and context agent and attenues at these targeted become. confidence and state of manager being relevant becomes that compare reconstruction in a project density

The investion sice emmoyenes combinations of our or seco ani-maner agone and attraceted terrice-surgered bootsels that have different since of scient. Spoke continuous provides as improved though burnt as the dark retion of these thresposies: 35 whether the combination is symposite or addition. Then, the moved constitutional terrapy of the process invention yields improved efficacy over either agent used as a single-openi. фанру-

-62-

The percent investiga rice includes the requipital or cocannot agent and attropologisated baggeted bustoin pagistored to enquest out or negoro producio acid medica sino campania presenta per su esta color de bias del proper proper produce de la color and an appear existence medicules sension suction persons that are addition or syntagosis. The law of the also excent passes completeless of one or you related these expents

pert planuabed tempo-turgated tablistic engagement to impose one or unormanishin soft Lindonidus tracs ting one or in ton planeour residentes angles fluides promises that have different after of action. Such a combination provides an improved dentity based on the chart across of times thempsedot whether the constitution is synargistic or additive. That the post continuous flowyy of the present impulse yields unproved allikary over

and set agent ared as a single-agent therapy.

54. METHODS AND COMPOSITIONS FOR BELLIVERY

- Para Extraction in processing recommendation of more general processing and advantage of the processing and advantage of the processing of the processi eurolement, or other cellel courty cureess. So certain non-livelibre controllerable, the effector prolecule is metal for liveleding local frames; proper so at the site of the livelet.

According to the protects to retains, the statements torque surprised become very torque contributing a second actid molecules exceeding one or more primary effector randomites and optionally one or more politony efficient motions are advantagewelly used in mediates to inhibit the growth of a counce, reduce the volume of a stores, or provent the spend of house 25 colds in an assembl, including a businin product, buying a cold businer extract.

Two present he requires provides spectacule for delibering sees or more pricease of the mode totals. But the croppy put of a total names pastor comprising administrating, to use surious in word of trush stealment, a phonometerical composition comprising an arrayment emonevers we see gollecase and reform lease extense tream ne see and myres a rapped be 30 pricedary effector gradienties operably finded to one or store appropriate participant. The propose inversion also provides medicate for delivering one or more primary effector respondent for the treatment of a solid tensor currer comprising administrating, to one edition PROFILE finalment the recipion on an emphasization distribution of the commission of 32 hapland appears independent and on most colorated supports the secretaristic classified, appear to case or more appropriate promotes. In one embodiment, the primary effector exchange

WO GUIDBY

ectASHHIDAR ma mai-magingenis ibosa c

econo inhibitory caryona, tra functional Ringhams thereof.

The present several to previous complete for definering case or poor fusion protoin of the invasion at the unastense of a modification convey completing administrating, to an advisor in our of of the converse completing administrating, to an advisor in each of our function and the manuscript and the convey sings on attenues, a physical field to deposit or consisting on attenues.

- based-singled (stocke) occeptually one or mean and size juicil or records, excelling one or more faither precise of the invention speaking littled or on or marker appossible processors. The greatest in resident will not provided precision for the difference or our cancer for processor of the justice marker one or some obligation employed by the difference or our analysis processors. The greatest precision marker on the confidence of the difference of a sould super-curver completely appointmenting to the individed literated or which temporary is considered.
- 10 polarinarenina wondochnica comparising so discussed suspectuar, mand house in comprising one or more include Ladi motorate cacoding may or meneral house provides of the investigation and one or more editions underside operating before the car move appropriate posteriors.

 To a pasted embeddinately the electronal flower-ray parted based as Delegantian Deletronaria.
- In a purious embodiness, the second tensor as productions in a color capacities on exhaustion of the parties of exhaust season as a color capacities on exhaustion of exhaustion of the parties of embodies as, the action is a manuscal. In a highly preferred in
- 15 release system. In a particular embodierrae, the sounced is a measured. In a highly preferred enth of times, the enth of times, the enth of times, the enth of times, the enth of times, and the times.

 The Seventier since provides combinescetal in Knear of one or more pointery affector.
- androunks and optionally, one to more measuring afficient molecular which are delivered by an strangel discrete largered having used an efficient like the hardest add optivities conclusionally delivery of different stranged measuremapped before in carriage and our zone different patienty afficiate molecules making applicating, one or minor different sprawing the constitution of the strangel of the strangel
- The ferrordices also give notes delivery of once or assert fundon proteins of the insurance which we delivered by an entiremental numer-support learning and the insurance of the insurance and the insurance of t
- Securities and replacedly, one as more officiars and residue of the ferrodities, valida the securities of the production of the control point in the cont
- 30 evida hasses sarbas, hor are on Hasindo do, parcurasa, encelorarea una catar coldiparture cauzen, lochading, has on delimina trapases files routen, trastrate del bossosit hanness youns, locast canare, pressare estores, estrafarl canara, etc has cauves, hass quesci, comities arouss, austribute canara, lyminal estores, party piones, giricata, partical, partical canara, lignorosite, color-secure, participana, gazetta canara, falcular canara, solid canara, lignorosite, color-secure, participana, gazetta canara, falcular canara, solid
- securitatione. The uniques is preferably an unique, including has not limited to endoubt such as copy, pipe, obicione, days, exes, knows, eec., and in preferably a securital, and con-

- 64 -

PATO (HUUSTER)

CY/EBROISER

professibly barner. As used herein, constant of a solid aureer, scolutes but is not finaled to, liableang tensor growth, inhibiting aurour cell profileration, reducing summa colluses, or inhibiting the greek of interaction is other parts of the body (monascris).

The press is remain provide a phasesocietic composition controlling a demonstrativity controller control relation and interest controller controller controller control relation and provide control relation and controller controlle

The present formation provides a planeau control competition comprising a phenomenationly and epithic control and one should be phenomenated interview comparating on a run one within and another amorbiding one or mace fluids: province of the forwards operately fellod on one or next oppropriate presentation. The present reviewing particles are presented by control one of the province of the presentation of the forwards of provinces.

35 gracement transportung could be a feed a companion of our or control product a cild and could encounted encounting case or approx finition posterior and the leaverables used quely or wome of tooks medianolists operately fighted to one or more appropriately product this.

The present inventors have previous processors communication competitions or photometers below could not all memorial measurements where the previous science and they proceed memorial processors of the country of the competition control and an extremely an inventor part of the country of the country of princing of them control and professions, much or many control of the country of princing of them control and professions, and or many recording of filtering professions princing of the country of any country of the coun

a pilotally was et tutte recordany effective indication, and a phase recordantly exceptivité menter. The person as tensor and key position position promophies receptivités par paramaterités par comparties cardier and est attention de nombre person fabblewoils comparting out est move faison persing a l'elle little vair des générally, one et move effective attentions. Their composition comparting can est a note faison amount of an est manual transmission position dessentatives comparting can est a note faison promotion of the lampsion can applicately some reason efforte manifolds, see the primateristicity!

investice and optically one or more effective modernies, and is phonocestalizably analyzably contest. In a specific analyzishood, the term following collectively manageable? Areas appeared.

35 by a regulatory segment of the Foderal or a state government or lived in the U.S. Fournmental or other grantedly management plantament in the state in university, and more providingly in insurant. The term "outries" soften to a citiatal, adjuvene, excludent, or

· 65 ·

OCTATION INDEX echele with which the floragewise is administrant. Such pharm-constant current can be posite liquids, such as water and rule, molecling those of papeleties, coincid, regetable or symplectic entires, excel ou perman pail, southern all, sedented aid, sections sid, office all, sand the like. Saine is a professed corrier when the phorperconduct compassion is administrate recounty. Salmo societions and agreem describe and physical solutions one also be comployed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable phenoscorator explaining landade morely, glacone, burness, massess, gelatin, mich, nice, flowr, of nike, advengel, sedium resente, giyostal teosportament, urba, spillere obleside, deled claim selfe advence, propylane, giyani, weree, extend and the filts. The composition, if desired, These grapped are the later the first of selections, authorized a trialisies, which, which, pills nder, position, susselved-retries formulations and the like. Opti Remodetics por, include of subset convicts cross are pleasuremental gravies of semential, but past, staron, uives presente, endices procharing, optibilities, rengentiture materials, con. Brownell unisable phonoconsticui menime une descritori in "Remingron's Pharputeintical Sciences"

by B.W. Missis. Study compositions will consent a thoughtwhicely effective personal of the therappealic spacemented numerotexpoint tracherie, in purition form, together with a maintail o manuals of carrier to as to provide the form the proper administration to the orifices. The Sporterior about deviction reads of attractions In a parterned embediencesi, the composition is found and in accordance with 29 novem procedures so a pharmaconalizat equiposition triapme for intervisional attaches to the to human beings. Typically, compositions for large core admireservice requelences in stuffs latto tio squares builds. Wester necessary, the competition may also include a may confirm agent and a least assessment seed as bigosoning to case pain at the size of the hijection. Germenly, the impressions are completed either experimely or relieved experiments and desperiment and desperiments and desperiments are the content of the conte has explained by excelled accordance swith an ear exceptive or excelute fordiouslag that quantity of active agent. Where the corrupted from it so be administered by influence, it can be dispressed wisk on policien house connecting stacks plus reversible) grade water or relies. Where the consposition is attaining each by injustice, an array of species water for injustice or sulfine 30 cast po leconycia sa ques que palanque que amb que serva qualen se serva que la seguina serva que pillo. The resease of the phermacontical consposition of the invertion which will be offer time in the westerest or presention of a solid bureau various wild depend on the seture of the capper, and can be decreated by attended hydrotest receptions. In addition, in who complete may opinional by the complete and to help identify opinional distinguity margors. The president dear, to be complayed in the forestimation will also depend on the come of administration, and the reciprocess of the opines, and should be decided according to the jurigosest of the pazorkinecz analoszki podsostypicowastapung. However, w inskio decaps oroger are

PETRITION

generally from about 1.0 of a right on about $i = 10^{10}$ c. i.e. log: opinionally from about 1.0 c. i.e. depict about $i = 10^{10}$ c. depict about $i = 10^{10}$ d. depict a c.f.c.ing, optionally from about 1 x 30° c.f.c.fig to second 1 x 10° c.f.t.fig. and optionally from about 1 A 10° of to Age to shout 1 x 10° of the Age. Effective does may be enterpristed from decoragement corresponds corresponds from the above or animal states for the states. Various delivery systems are known and can be used to minimize a

- physimmentical composition of the prepart intention. Markeds or immiscular models by: are not lip let to immaterned, becauseoular, immentional, interveness, information, increditural, intranspol, opidural, and oral positive. Mushodo of introduction pary also be introduced (e.g., by direct administration has the area of the restor).
- independent is (e.g., by direct administration) who are and of the density.

 The companions may be independently any occurrent are parts, for example by interest or boles injection, by exampless through epithelia or meconistrates linking frequent months, second and undersite of the contraction of may be drainfely to introduce the photosocratical comprehient of the investion into the contain no consumption by any selection on an experience of the first system and interferent
- injection; inhermaticular injection may be facilitated by an intersecution by relieses, for exception, effective to a generalization and an Occamina programs. Pelanoscopy affects in which can also be employed, e.g., by one of an inhalas or nebolizer, and financiation with on consensations and a
- In a appoint a entroffences, it may be desirable to administer the plane. compositone of the invention bently to the sace in read of treatment; this may be acheeved compositions of the inversion health to the next spread of the interest in this stall, is a state-by, for example, and the typ way of the interesting, lacked influent conflicts, employ to physicists, by states of a callective, or by season of an interesting, made from phene became of a porcess, nex-ground, or philiphone control al, freeholding another sea, each or a plackation metrith made, of filters is a consecution and an all probability of made in plackation metrith made. Or filters is a consecution and a place in the control of made in place of the other for former
- seems in some encolaration, admissionation pass by the district injection with risk of the first index of a milk of a milk grain from our completion to generately also for grain of the settlement to use or grained because competing one or more a primary efficient to controlled and opinionally, can or more recentary efficient mechanisms and opinionally, can or more recentary efficient mechanisms and opinionally, can or more recentary efficient mechanisms and opinionally can or more recentary efficient mechanisms may be delivered in a controlled reference sporter. The assumed amont happying to provide controlled and one or more the form proposes of the Inventors and optionally, one or start officetor motion in early clea be debreced in nonemotive relates system. In our emboditation, a purse may be used (see Larger, report Selton, CRC Crit Ref. Signami, Ling. in 200 (1987); Sectional et al., 1982. Strigery 85:507; and Shatelk (c.el., 1989; N Read, J. Med. 377:574). In consider embediatest, polyaceric quaurista can be used (see Medical Applications of Controls
- 35 Holesse, Legger and Wire (eds.), CRC Press, Beers Rates, Florida (1974); Centralled Brug Bioarcsishisky, Doug Product Design and Performance, Smokes and Bell (cds.), Wiley, New York (1969); Ranger and Popper, L. Marcanol. Sol. Rev. Mocromet. Choss. 23:50

B/Fe/HZ/SBH5

PCCCPRMINISHE (1913); see also Levy et al., 1985; Esisono 228:160; During et al., 1989, Ant. Newcd. 25:151; and Housed et al., 1969, A Newcourg, 73:765), in yes mather emballment, a controlled release system com by phone in proximary of the themselver larger, i.e., the bests, thus requiring only a finction of the tyresenic door (see, e.g., Corcince, in his displ Applications of Canaralist Release, supper, vol. 3, pp. 115-136 (1984).

- Other contrained reference systems are discussed to the seriew by Langer (1998, 5 Science 2-9: (927-1533) and may be med in commercion with the administration of the arecrosed reconstructed because computeing, one or notes persony effects malescale(s) and applicably, can or proceeding effects authorised.

 The investigation provides a physicanomical path or his computing one or order
- and extrements are provided to programme programme and the companies and the design of the contractions of the fine programme and the contractions of the fine programme and the contractions of the contraction. Optionally associated onto (such acceptance), care to a notice to the filter. preparition for a general material agency respecting the mental attack, the or sale of pharmacounteries or biglinghas purches, which aution reflects approved by the reserve of mage filtering, are or sale for brames a facinisms tion.
- The present expection who graved in methods the westing a solid terror comprising administrating to an exhaul in need thereof, a pharmacounted conquestion of the invention and at team one other known canter therapy. In a specific code-silvent, or prices with a soled paper current in admits twenty plant materials corporation of the interdise and in lean one ohe coheraptude agent. Hampides of chematican paste agents include, but see our ligatest on, eliphoin, ifrequentle, necessor much as topol and pacificatel, repolationists.
- inhibitors (e.g., CF(-1), Nipricess, 9-AC, 2020G-21f), perceichin, viscositio, malipieta, 5-fluorumei (5-FL), krasovoja, vironišias, serosisi, gancialisis 5, gantičiais D, carefor, ristopyčia, respeciór, exerpeciór, riscristas, vedicais, netalvin, documbiole, des ecretoires, abryanesy unberic diese, asiesuments, sufficientation, estimanyon, estimanyon del debydratesionerum, gluouseticolds, provinc, sessetiba,
- latoreine, peoperatelel, and preventicle beautige, and cytoxen. The person investors includes the ergonalist or tomorrises estraisment of
- phyromenulast composition of the introduce and at sectionary agent such and characterispiecie agent. In a specific amingtonies, the phyromenotical acceptables of the invenden is administered prior to log., 2 hours, 6 hours, 12 beaus, 1 day, 4 days, 6 days, 12 days, 14 days, 1 month or personal amendas believe) file administration of the anti-compar agent. In marker specially sent-admost, the plannet coulout composition of the execution is educinismed relatequencia (e.g., 2 bones, 6 kerrs, 12 brurs, 1 day, 4 days, 6 drys, 12 shops, \$4 days, it mosts on several smooths after) the ultricipatest or of an anti-center op-
- To a specific embodiment, the phonogenetical compatition of the breathing automatest again. controllarity with no esti-concorrigion. The invertion encorrigions combinations of each cancer species and statistical transit despited backers experienced to expens one or must

andrie with material or are additive or systemistic.

etors of sod-east respons and allow The invention also areas topics bargated bacteria confirmation argument on our remon accident mid malescales exceeding care or more effects a medication profits foreign promise this bear of finese more of article. Such a combination provision on Improved thorough turner on the dust unique of these thereproduce whether the combination is symmitted or mission. Thus, the movel combineshaped through of the propert transition yields supposed affiliately over differ upon uped to it to tiple-organic theatery.

In one emboritement, an assent to be a rolled to their catacter to editablisher the phonocounter is corresponding of the invention and treated or the audiente through (e.g.,

gament relation of x-ray arthotoo). He a specific antholonest, the intensive providing a merical to treat or prevent senser that has shown to be refused to real time thereto. The pharmaceusical correposition rate be admissioned concentratly with radiation through Abstractively, reduction sheeply may be provided and subsequent to absolute the of a phonoment and composition of the inventors, cretically at home as born, invitores, Q.

tonor, a day, a week, a resent, assempredicably several merrics (e.g., up to three months), tipote, 4 day, 2 incute, a promote, appropriationally annual microsis (e.g., up as later contract), behaviorant and institutions of informative annual contractions of the contraction of the contraction of the phase contraction of the phase contraction of the contraction of the phase contraction of the contraction o

the type of causes to be especial. For example, but not by Way of Seriatries, rowsy relations on be understood to a description of the serial radiation case be used for skip coastes. Objettes my eminary antickerespe, purb at

andioastive incorpes of andions, cobolit mad miner obsesses yeary who be adericed to exellerance to mediation.

exponentialists to mentions.

Additionally, the Direction also provides methods of travisional of extent with a Phenesecondous comprosition as an advantation to subdition therapy values the articular during his province or may provide to tends, any available in transcription or under provide to tends, any available in transcription or understanding the design of the province of t an effects, for the subject being trained

59. BEMONSTRATION OF THERAPEUTIC OR PROPERLACTIC UNLETY OF PRABEACEUTICAL COMPOSITIONS ON THE INVENTION

The pharmaconalisal engagesistant of the mornalism are publicably tested in since, and 35 White in with the cities desired the separate or prophylaptic extinsty, print to use in heatings. For example, of view actage which can be experted that amount whether administration of a

-40-

RFD OLUSION

ector/feature.co

speed for phanes occasional composition in indicated, include in some cell or here wany i in which a patient come carryle is govern in comen, and ary coul to or otherwise administrated a pharmaceptant composition, and the offices of such composition were the distormantly is Phonometrical companions of the instance can be trained for their stelling to

- magazant suffraged incommo calls by contacting impump calls with a test plasmouses into consposition or a control and charmoning the ability of the text photosoccusical companies to perdukte (e.g., isomers) the biological solving of the location code. The ability of a lest composition to modulate the biological exploy of immuon cells can be in mosed by shorted fig. 1 repression of cyclicies or endgess, descring the publication of furnishm cells, shorted the octivation of symmetry wisherston, descring the octivation of symmetry wisherston, describing the address that does of
- instance cells, or descring the differentiation of interest raths. Techniques knows to the of skill in the art one be used for measuring three extinion. Fix example, collular prodiference are to assign by Widgesides recorporate aways and region like nett
- counts. Cycles wand subgen correction can be assayed, for exceptic, by incommensely Including, but are not flavored to, competitive and sen-compatitive array systems using techniques such as worken blots, immunicibies charactery automicinationary, ELISA. manys, proceptific secretions, yet difficultus proceptic macricus, increase Affineles assuret,
- angle releasion armys, complement finalism agrees, fournese discourse aways, flares 29 freconcesseys, prosing a management and PACE methyla. The activation of signifing replica can be appayed. Not example, by blosses assure and electromobility shift are set (EMSAs). The effector function of T-collis can be commend, for extension by a SiCrnelector energy (pine, e.g., Palled line et al., 1987, Conser Fast, 47t 5974, 4619 such Elizabeth at al., 1993, f. leumenthropy 14:332-336).
- Pharmacerocal energiaeticus of the leventee can be tested for titel ability to 25 reduce textor formacion in ani mela sufficiag from course. Pharmacentical compositions of the investion can also be study for their skilling to allowing of som or some system accurriance with a solid terror encour. Purpor, place woodiced compecitions of the inversion can be tested the thoir chillry to feareast the surrount project of patients suffering from morbid times concer. Terminate Research to these of girls in the annexa be send to analyze the function of the phorosoppiled compaction of the levestion is suimals.
- In various specific ensurationates, in view somey care her curried out with representative cells of cell types involved in a polici moner causer, to descriptor if a ghazmaces Goal composition of the insecution has a derived of the upon make cell types
- Phaeroconsticut compositions of the investion for one in shoppy can be tested in turbable spirms medal systems prior to teating in Sections, including for see Husted to cets,

(178)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

PET/FINNIS/262

paine, cidence, now, monteys, pigt, days, subbits, etc. For se sive seeing, print to administration to burners, any colorate model system below by the set energies used.

The following sectes of exemples are generated by way of illustration and not by way of illustration on the maps of the investign.

6. EXAMPLE: BYPRESSON OF THE G OF ATTENUATION TUNOR TRACETED G. LINONIS, LA
THE BOOMING CONTROL OF CONTROL OF THE CONTROL OF CONTROL OF THE C benneda, completing a makin sald molecule encologie TOM finally complex are capable of expressing the TNP fee by consider.

61. CONSTRUCTION OF THE A MLASSIONS

The placetics described bestinger we to the structure countries of specific surface the contribution. As well be spacent to one of principle title for any potentials and/or effecter molecule-encoding metric raids such as the ore posterior males TRP-in coloring.

15 models mildt prog for acpliced with other appropriate proteoner or effector eroborolar by controls known in the six. For placetid-board baseatal expression of effecter melecule-econolog nucleic poids

using the not producted, the please of Techna (constitutivity at each of Constant) or Tactical (constant) are about from the Tempor) over mod. However, our found on the Constant 20 blood size as the stact easies, followed by a smithble clocking airs.

6.1.1. THE PCET FLASSED

For placeast-traps in across dependent of offerer ambient co-coding matrix Lade wing a deal LP_p or AP_p presents, the pCRI planted was commanded as follows: Planted 25 pCR37 (N/ch et pl., 1998, Char 82, 120-120) was community closed with the marketies puess remind and, prins, turn of 1721-1729-was propagated foreset will call to this filter engine Co. It and his most day will make plan makeure, filtered by obserge with the protocoles organe Junett. Next, do remedice J 42 to Ingonet was figured above 2.3 for \$10 filtered filt Registed of pUCTS (commodiscially available from (SUGSO) or waste put \$10 filtered filt Registed of the commodiscial carryets (Rousell) and face only which waste, 56 been nucleate, followed by disweep with underline conyers off (if. The swedtest), I the band was include. Photosis Traitfolds one postably dispersed with the restriction entry one. Cital, thinse-curied twite To DIKA professorate, Referred by clearings with AFRIL. The recoluen 0.6 th burst, containing the minimum and monimum, was then Septial into the A. I kn pCl fregresse to give physical pCET. As with ThisPAN or ThisPAN, pCET complays 35 on Novel size on the start readon, full level by the Yest lieft stratistic cloning size. Growth of

No tuday

become harmonic any planned constrong the λP_{ν} or λP_{ν} processes, was perfected at 39°C

64.2. THE PER PLASSES

A piceraid, decoted pTS, employing transposac-auditated circums con entrepor of affector unbody escoting profess rook, was an extensive as follows. The placests profitable (conjunctively assistable from the Assistant Typo Colmer Colloction (A TCCI) was element with president manyons from Til and the 4.5. its band included. The Submoverie applications are Consultant medical acid was included from K applications sense to the Consultation with the Consultation of the Con a forward prison of sequence GAAGATCFTCCCGAGGAGGGAGGGAAAFC (SEQ ID NO.11, and a spream excess, of requests

CONCLUCYCOMOCITICIACIOCICIONS GRAAD CATCTALIDACTICS (SEQ 10)

NO12). The PCR reaction prisoner was alarmed with restriction enzymen Fig. 11 and Jose (4) TAS I. LEE FULL PRINCIP WE WANT WAS A SECRET WHICH PROVIDED HE PARK A PROVIDED BY P

6.1.3. THE RIVANE OF PLANSING

A places i (pXS-TNF-a), for the per B-mechanic elementational imagination of a $m_{\rm c}$ promutes driven transmitter or considing markets acid, was constructed at Scillows. Plannid PYA337 at the ASD photod PYA775 (not, e.g., U.S. Petro So., 5,900,493 to Carice, (d) with the origin of registration registred by that of the coRFL plantablest, e.g., e.g., illustrate and McKeleici, 1972, talentons 2,397-406). Fluence PEAS-172 was cleared with contribute congress of or i and bitme-control with many from machines. The bitme-coded frequent was then cleared with material company and the A.S is Dish frequent 23 al., 1984 Norsey 3 12-724-729; and Palament, et al., 1996, Carete Biothera pt 11:46-153. en deploted in FIG. 2, were then steamed with provincing amount Mar I, black anded with TA DNA palymenus, and than observed with receiving response with Island IV. The resulting 0.5 to Ingress was liquid into the 3.7 to PVANSOE Suggests to give pleased.

Add FIRM of Add FIRM on the State cleaned with remission conyect dutil, and to 1.5

bi fragment, considing the ere presented distinct THE or exceeding mobile midd, and Reach type the store lift also of pTG to give planted pTS-THT-s.

GIA THE ATSPARTMANNER

A plannid, despited pTS-650P, employing surreguesco-condicted characteristic jungration of the BRP escending people's mid-sed series protein spin's selection of other booming-modeling models; solds, was remains and as Release. A 92P exceeding models

- 72-

Prib surdays

and the missived Throughman's ATM (Immercating methods from Kindle Villac, ACA) or Child bias in Freed may not represent COLORO/COTOLACA/

6.1.5. THE RESIDENCE PLANNED

6.1 RYTECRATION OF REFECTOR MOLECULE-ENCODING NUCLEIC ACED BYTO THE SALMONNELLA BOSY CHROMOROMS

20 ENGLOGICO DE ROME.
This popular described byte employs alone C. Edipsenable remains macrotyphic for acrite englosis, and placed to their necessary alone acrite englosis. See the land which necessary alone provinciply topics ghomeomoral languages in two an anti-ruly team of their macrotyphics. Hence on, it is well known to the acritical majors. Hence on, it is well known to the acritical majors.

to artiflux color selection markers can be used so enfort for demonstratin integrants, not 25 years markers are stronger of the Invention. See, e.g., Kloskers et al., 1991, Merk. Bacquest. 394.139-109.

307.003. No hashers for expension with the control of the Invention of the Color of the Invention o

If the option along the placetic containing without exclusion and multiple multi-less design and in a sign between the production of the control and the control of control of the sign with the control of the sign without the control of the control of the sign without the control of the control o

- 23 -

Effector melacule-error sing models upd expression any to rematered by say of smetable methods known to times skilled in the est, texts us by conyunic notivity, birtipical

gothicky, Northern bler medynin, or Western blot enalysis. 62.1. DELIVERY AND EXPRESSION OF SALMOFFELA-EXPRESSED THE-S.

A net prompter-driven TMF-2 successing methic acid was careful into the Base HO nice of \$175-GRF as give a placeted, descript \$15-98PTNF-x, as described above. Placeted pTS, BEPTNI-1: way whore provided into our attendanced strate of S. Systematrians, and/a VAPP20009, (see Informational Publication WO 904) 1053) operation to be serif- useful Sect the perception was it make, dynamic based (MAC, 2), by smelted methods known in the set.

- tae procepts was a meer, grawn, deard (Reica, 3), by amended mericals 300mm in the en-friction is finished in an in-sententime, being action of the plan of house house in senting parame-ations for activation of the earth monology analysis and sentention a series' phononym. Accordingly, Accounts beforeing a characteristic site of the Control of the Accordingly, Accordingly the contains beforeing a chemosporous law grantion or the YTH²-co recting and necess release by plaining the independent function in this law pulses comprisons via administ. But the six plaining the independent for tent of the law plaining the containing the plaining the six plaining the p
- of the jurcoition, Submoordin fundaming a chromotomal integration of the TNP- o successful medical medical participation of the TNP- o successful medical medi Western blet molysis: Specifically, BOP-a expression from a representative ser C.,
- magnetials destribute closes, deserted \$16-BRF199F-s Close 2, is aboven to PIC. 2. We equivamentament content, extented prible IRTERIO & Control (s) is described in Co. Necessaria in the control in Co. Necessaria in the control in Co. Necessaria in Co. Necessa

7. BRANDUD ATTENUATED TUNDE-TARGETED BACTERIA TAPPESSENG ONPA FERSION PROTEINS

- Periphermic Incoding ton of proteins by Anton to various Signal popular in dependent on both the signal payrate and the protein. For example, proteins can be appliced to the perioderate examplement of bacters by fotons of a signal popular as the estilar terminan of the parties. Without Treatment, profesorie forekento of Anterod to facultate of the component (authors profesor) by equiting the component (authors profesor) by equiting the component to component to the component of the com
- To content, eyingles sale handiscripes sequines that the compensant between both the restric

D/Date_cdays

CX(000013243

and other transjourns of Lucturia to opin; ha for relayand has the summorting confinenced. Finish: pulphyrate bootlandor of centiley profess may said to his help it a stickly. A valley at metabols is possible as many be south or agest as officient indicates the investion to the pulphone. This entropie distributions that the finish of the output.

PROCESSING OF AN OMNATOR - CUMON PROTEIN THE - REPORTED IN THE SIGNATURE CONTRACTOR OF PROPERTY.

10 genetic-drivin uspat-TiPe - fulin protect is 20100 factors. we causined by Walson bias and whole rel's just Endpanels beclaimful very examentable by climate of the present in decopress prices a manufact "For by ging in oppositus, on surpras located just projection, to a surpras located just projection, to a 2010 for decop. Obliving industries with E*(0), consequently TiMe or restable of the regionment of TiMe - and other insighting, and produced just TiMe of the regionment of Time - and the region of the TiMe of the regionment of the region of the TiMe of the regionment of the region of the

Sub-convolve teach bett chitigs and channes multiply integrated PDF-exerce College controls as left, experiencing the reverse operations plant on PTF-ex, year some to pendance observed by a pendance control plant, in part of the pa

proceeding which marginated is 2, red. Therebox, views unknown whether consequentation of a scenario process produce to the contract floor to a revent of over-shortest part on a scenario processity appoints in 25 persons enumerated and supersolate of a processor.

22 and 17-17-2 fixed process in Actual Column to the second contract process of annual processor of annual processor of annual processor of annual processor.

PROCESSING OF AN OND A TRAIL TURK ON PROTEIN The sholks of the owner Agent popular to people reductly localize TNP Service

Totalism was considered in Trick (Title equations, a very considered in control of another total control of the Trick (Title equations, a very considered in Title Title). For interesting of the Title equations, a very considered in Title Title equations, and the Title equations of the Title equations of the Title equations, a very control of the Title equations of

.

Service ordina

prepared (A.2 ki) and aspectored (BC ki) does of NTAEL (BC 2, large 2-0), where it branch over expressing the cond-TRAE, with the life I preside expressed processed farm explosively (FIQ: 7, Janua 4-7), indicating the the Note i junction provided answerficient processing.

Player results deservativated that findought the resource leaving TRASS, po E. coli copel cignal popri le recebed in preiglamente bondization and proceeding. Portice, it was separation administrative processes as the supposed promin would be trade to the bacterist bost on a rotate of everwhelming the noticel processory approximate. The present description of convenies of a processed argul-YRAIL flatter post in information the flat day against action to a process of apparent and a high-lovel according of

7.5. PROCESSING OF AN ONE HOLD IN-2 PUSION PROTEIN A promptets efficens exclosely (6.-12) was expressed as a finite poticle. Pusien of

masers (CESSA) kill-2 to the wild-type-Chapte pignal properties, most obove for THE-2, and TRAIL, 64 m; parent processing of R-2. In order to exposure the periplantic breaksarion on 6 processing of the houses (L-2 cycolans, rooters become (C125A) 12-2 over Franci to a modified oraput signal paysion, deposed outself it,), as depicted in FIG. 5. The applitted court types I popular was randiffed by replacing union acids 6-17 of the court signal with those depicted to Figure 8. Requesting and processing are shown at FIG. 9. 2) (Hunt 6 and 7). Each lane supresses a single class. Results of Western blot conducts cocleaned that virtually operations proceeding was absenced with fire (tigad)(45.) signal peptide (FIG. 9, kees 6 as 8 7).

1.4 PROCESTING OF AN AMOUNT OF PURSON PROYERS

A record fields; prototic was estimated for proplemate feedbackup and pour 25 of homes III-2, and compared with the fundos prouds of Section 7.5. The expression und repressing of restore from an (C125A) IL-3 flored up a prodiffed priori signature resto. depend phot(RL), as depended in PRAID was neuroless. Expression and provincing and above in PRO-9. Parties proporting was observed with the symbolic photo(RL) Equal popole (PLC 9, larges 4 and 3), who can more examples processing was abserved with the competitud algorithms procedure (PLC 9, fearer 6 and 2).

These reports in discuss that benditation and processing of IE-2 was provided by different signal payable. The weaks play desponses that produces to be benditative; of form objected based in our over from any parties of confidence of confidence of confidence of confidence and confidence of confi 35 Suprettin.

The results of the fusion protein studies indicate that a networkey effector protein of sin invention, such as M.-2, can be expressed and brest and to the becomis) periginantly

WO dayster?

PETATRIOUSES

plates with vite a protein signal projects such as Obju. A or Plan. A so will be exposent to conordinarity with its the set, when tajent sequences can be extend to assume particular coin interflations of an influence mointainer post parts. A set of the interflation is symmetric to control of colleany shall be the set, when reflected molecular of the invention can be multi-likewed for the others motivated described in the recomplishment.

Example: Anti-Tungor Represency of Salmonella Salter Apurd Explessing the Majure Bords of Typa

23.6 following experience demonstrates that an entraneous interest appeted hat total and as distincted becoming a security and economic protocopy efficient controlled (e.g., a 7 TMV firefully servinise) can distinct the primary efficient on measurables accurate and course a description to better relation.

The Addy of TWA expression in Indicates the entire time of General General Conference of Conference

In the group count rings abstracted from surgered Softwareds coupersteen To Para, where it requires on our appeared by the record work. Individual section, with complete requirestion, control of the of which selected from endough for the control individual selected programme in the control individual in this programme is the programme in the control individual in this programme is the programme in the control individual in this programme is the control individual in the programme in the control individual individual programme in the control individual individual programme in the control individual individual

programmers; uncertaint in FIGU Fig. 11).

These results depositable for distanced introducing and districted are shift in eggent and data was an effective markets by advanced Time Burdy results or to the eggent and data was an effective markets by the size of the original produced and the effective results in the secondaries of transment and markets of the end of the effective respective secondaries as a congrand on present fluoremeltar stations which the not expects the Time Statisty.

The discretization of complete intent enginesis, by Schwardis experiency Trib-efour Accessmentily sottypeed marks with, induces that foliaginally effective 56 marks on creat these Accessments' staggards effective residents accessing metrics address. Selfo in cetters

PC19080031243

9. EXAMPLE: ERHANCED DELIVERY OF NUCLEIC ACCD MOLECULES BY BY EXPRESSING BACTRISA

In this to a form the third MI and the good of colours in the third of a possible for the colour and the colour and the colours and the colour

Tetile 2	
15 Phonist	Avenue # of Assp Colories/Transformeden
prinches alone	(25
pticphe-bap (gSWT)	363

"The trade demonstrate for injurience of IRP demonstrate in an order of any planed sensor in the instance. The translation in a "recipion critic" with a processor in the contract of the critical sensor in the critical sensor in the critical sensor. These critical sensor indicated release of the critical sensor indicated release in the critical sensor in the critica

14 READIPLE SOF RESIDENCE DESCRIPTION DATA TO THE PART TH

The Information number (constitution that assumed transcripted becomes our be inclinated to consist ERF to outplantation with one or insere solitoner embourate to entire use to delivery of efficiency and houses to surrose whiteof detailabilities the ability of bus techn to taken the matter.

Solid betwee used this restr details of the production of the production of the region of the region

9.00-14 0000-2

Counted from the first by appointment, washed, and compared in phosphere believed paties at 2.5a for collabet. An alignost of 0.2 cd of the cell suspension, for a cont of 5a for cells/proves, was injected on Bey C. Whom Water volunts conduct 150-260 and, approximately 10 days after implentation, the other water and united from first prompt of ten microard out: group received a different processor. The control group (curve #1 co FIG 12) monived 0.2rols of PBS. Another group received 0.2 mJ posterolog 2x10⁵ Fig. 12) antiched (2 antich CTSS. Ausbarg group recorder (42 an in Amazonia) (2007).

Californiane of the Submessed Enterologisched desiat of Submosed (4 VMESSIG) (2007).

Fig. 12). The third group moderate 2 and containing a Subfi of LOuferouse of the attenuated containing and the LOuferouse of the attenuated containing and the LOuferouse of the attenuated containing and the LOuferouse of the Submosed (containing and the LOuferouse of Submosed (containing and the Containing and Co jo describé es 2 cols, affançais des inscraors believe, wisions findation en la mantendata, that it is partially constitutive in Satisfanciale, producing but to receipte levels of six BSU. protons, which are faciliar enhanced by also SOS names of the research continuencest. Mice injused with BRP-expressing VNP20009 Subscoreth slowed newly introduction entr-turous responses to their injected with non-BR h-paperaing VFP/2009, authority memorial feature serviced or memorial pooling artifacy of these Submanufile is not abused by BRP expression. not is their shirty to inside to see growth. The estimate of BRF-experision on attracted to search of the expected at the expectation of searched ECV-thymidina bicase (HSV-TY), which HSV-TK expension names is the loss of VNETACHOS transcripted blokes obilities (Parmyleta et al., 1997, Concer Res. 57.4537-4544) These, the SRP system cracks used to enhance the delivery of pricery and/or secondary

II. EXAMPLE: MICEPROMOTER REFRESTION VEHICLES This compute determinant the to wave and it they experience of a contributed and a molecule conciling reported much on \$6 get under the control of the paper promotes in an armonic of the paper promotes in an actorizated invece-targeted brackets such an Solomonia.

effector multipules to manner vidigest Santes modification.

HAL CONSTRUCTION OF PAPERSON PLANSINGS The people provided was classed by PCR simplification of the replace from an inches of 36 colury of wild type Subscapell's applicant for (AVOC 14028) using the following princes: Fernand: 5"-AGT CTA GAG AAT CAC GCG &ACT AAC CG-3" (SEQ ME MCHS) REMOVED STATE CAT GOA GITE ACCUSED ACT TIT CAT (BEG ID NO.16). The FCR conditions constraid of 1 eyels of 95°C for 5 reserves, 31 cycles of 95°C for I solve to 45°C for I minute, 72°C for 2 minutes and 1 cycle of 72°C for 30 spicusos The PCR product two choses and the PCR 2.1 closing vector (foreigner, Carlabad, Odffresia), and is referred to be Pro-Title 2.1. The Profit PCR 2.1 reades was disputed with Novi and Novi. The part Support

WD IN ISE

was gel indused and is good into the B-gol Zeens vector digested with the name daily well.

Zeens (Vancoury Gashade Bankis Na. 296495) is a proposerious B-gol plus sold generated. by claring the first open making farms into pl.C.W. The remines placed was called pent OCAL.

ILZ. NY PTERO EXPRESSION OF 100 F POAL AND MEASUREMENT OR 100 PEAL ACTIVITY

Statement of the Art Could be Fed. 1344; for the genetic state up of the senio. set 100 95402 (3) or VPT-2008 (COT in FRI. 13A) but heirs popt ACAL sense. names, the millionessis of vitations (CUID III The LTA) bandwing approximate. Supply supply that promotion is read to condition to an Object of 1964 in Epile studied; were manuscoold for the residual of Diago and Line (1974, L. Mort. Balt. 1984-1987). The residua is also not in FULL 11.6, and demonstrate appenditionally 16-10 34: Bold suduridae of Diago and Line Object activity opens growth of Ob bandois moder statements conditions.

11.5. Of PERO EXPRESSION OF PROPERIAL AND NOR SELECTION OF SHOULD BE ALL ACTIVITY.

CRIS of the Submanila and \$31456 behaving the max-dod expension. plentilds, a NEP expression phases of gallers from ECO (O) (Victo, California), which consumes the pCloDF13 BP2 coding requires number the central of its early promoted part conjugate the proposition pharmate were injected independently into terms fearing rate. Pive days yout injection, transet and livery were brevagenised and betterin were instituted as also value.

10 the prosected plannike for payl'-Bgal analys field did not recorded with the 1000ty of their historice to singlet became. To militious, the beauty and fiver becomprised a word or measure find arrively to determine whether makes fight could be recovered to very and whether the pept' protector was endested in an americal business covincement. The trivilla, where is PRO. 1.36; Intriduce the master of pay? progetive satisfy in the same or servicement. There is not rightlifered increase in New responsion of Figil over the background here!, which is thought to sate from the hear activity of Can pay? promoted in the nextible live: environment and/or the low inspelling of the treatest vestor to the first.

12. ENAMPLE: TETRACYCLINE INDUCERE EXTRESSION EXTENT

This example demonstrates the expression of a pucket and molecule resoling a proposes gone such as fileral lander also control of the our processor to an attenuated horsest tragged of between the second of the second of

The set processes were channel from a mini-TN10 interpretor by PCR $\,$ arrolf feating uning the following primary:

Foresact 5'-GGA TOO TEA AGA OCC ACT FTC ACA FTT AAG T-3'(58Q TD NO:17) REMINE SWART FOR ATT OFF CAC STY TOP CYA TON CUI (SEQ SO NORSE)

.....

31 DFT of greate

TY/CEHOUSE41

The PCR conditions were as followes: the cycle of 95°C for 5 valence; 35 cycles of 95°C for 1 relates, 60°C for 1 valuess, 72°C for 2 releases, and ear cycle of 73°C for 10

The — solid p (Ch. Express or ways) to before the close of the D (Ch. 2), in control p (Ch. Express or ways) to be the policy of vision than the D (Ch. 2).

- solid by a processor for inguise to complete the policy of vision than the D (Ch. 2).

- solid by a processor for inguise to complete the policy of vision than the D (Ch. 2).

- solid by a processor for inguise to complete the policy of vision the policy of vision to complete the policy of vision to

13. EXAMPLE: INCRETTION OF TUMOR GROWTH BY ATTERNATED TUMOR TARGETED ALLEGO/ALLA EXPERENCE ENGINETATION

The following example determinates the procession of examinate expression attenued traces copyright attenued traces copyright and for far time utilizery of copyright extension by such Spiriterials.

13.1 CONSTRUCTION OF ENDOSTATION EXPRESSION PLACEOUS

Deloyate was PCR emplified from a burne place and eDNA Richy using the aboving planets:

Provided - GPTQ TCC ATQ GOO CAC AGG CAC CGC CAC TYC CALLY (88Q III)

10(19)

ROWSE 5"-ACA COA GOT COT ACE POG AGG CAG TOA TOA AGGT 4" (SRQ ID NOCELL

The revoluting PCR product was observation the PCROA weeks (lar-largery).

Heraldishibited re-december was PCR resplicied using the score constructed yielded as a

tropion with the following principle
Fronted, 3-Ging that CAC AGG COG GIGA AND GIG GOG ACT GAC CAY
CAT CAT CAT CAT CAC AGG CAC CGG GAC TROOP (1889 in MOST)

NO.27.

. The continues he the PCR amplification continues of a cycle of 93°C 5 mm; 20

-81-

sycles of \$5°C. So it min, \$5°C Se 1 spinors, and 72°C Su 2 minutes and 1 spelts of 72°C.

The resulting produce to an EMA diagrams with Mod (5) and thought (3) resolved as less according horses reduction being the popular angentus.

PROTECTION WAS ARRESTED AND A CONTRACT OF THE PROPERTY OF THE ged instanted and legisted laids the pTI_CORA, means that has been constrouted, the lower was entropied. The rigidation production products were considerated made if, cell tild product constrained according to the const

10 vector YAJAM m a Neolifernith Engrant. YALLM is the and placetic PYA272 vector i el 10,100 mil a inversementa compresse. L'ALLION de las per placemes e indices (Currier III, U.S. Sencei No. S, Red, 1255 mil alte origin e l'implication implication de l'activité des COREI (Descarda aud Herichie), 1970, Dividente 91,090-1755, Peterdé DEVA, proposed fixes protétive ofençes una diplaçad aud munaformed loto the Santon crefts arabé 8204, active 91 VNPQ1[109 with no and remarket. This state was generated according to the multida 19 described to Outlies TR (U.S. Person No. 5,819,483).

tal. In 1977A0 expression of enbostatin by attendiatin junior-targeto salamonia.

Difference excitors of Cultivariate VNTITHEM and E. colf Differ excito containing the pTic(904-lexis) whiches-confession planned wors grown to micking ; how (CD) ₆₂₇ = 0.0-30 O.S., as which point exch cultum was upin, can half remixing O.J. while BTOs for industries of the promoter materialy and the other half excelsing on BTOs. After those further bones of growth, becomed intracts were prepared and the exponention of describinishment appears was confirmed by Western blue amalysis with an activitation artificity (Clastick, Folio

No continued by restort a bioteomorphic wild in an extramentar attribute; presents, and, Allo, Collibriane, PIGS. 18 And 18 bid before the extraine of the Visuance listen which discontent policy of the Continues of the Continue Heratheridine entiretries is captured a single band of approximately 2500, which is the problems or review weight for the decisor protein.

The broadstricks-endough finite growing was similarly expressed from the YA3316 plannic, wint the tilture the re-pressed to depot expression. A problem of the provinced cross of 25 kDs som detected using the crisi-bissistic entitledy, as above in FIG. 16. In TTG. 16, oil business cultures from which the complet were darlyed had been induced with 0.1 seld IPTG for these bours.

. 12.

9/0 (0.0339)

PYVÆRROGUNZ

13.1. SEVICACY OF ATTENUATED TUMOR-TARGETED ALL MOVELLA EXPRISSING EMPOSTATIO ON CHARGER COLOR CARCINOMA

Color of newto dispasses of 2000 mg/ volume with applicated substances by a 9 work of the most COTECO mg/. When the same with applicated substances by medical formation of the formation of the formation of the color of

- y will die General (1994) while the new vergers and the 600 Mars, Allay are yell die General (1994) while the new vergers and the 600 Mars, Allay are produced from the 1994 Mars of 1994
- mediatrial vera approximation. 2016 of the median torse view discount existant, and over 2006 loss that does mellian home one for an admission seaso view 2018 of the control of herborrog on unpay review. Of the near-leving selection, many exhibited action rates ground, as followed by yeard changes in terms one days, and one oblighed a strong reproduced fine treases. Procured to provide a control of the control of the systems of post problems and approximation of the control of the systems of the post-post post provides and provides
- 20 \$40.77.4255 (red) give mely-upon accordance in molecule (MASA. The delivery systems for reclassed is an electronic accordance in molecule (MASA. The delivery systems for reclassed in tendenced for the super-state of FEGS of the Companion of the molecule (MASA. The Companion of the molecule (MASA. The Companion of the MASA. The Companion of the MASA. T
- you reconsequencements are not you great and the table and inclined an inclined production in two withings one right, wherein the desires or undersequented as proministed by the lates of the late of the late

.21.

35 pre-ward the process first accomputating in ancientes brother.

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N... 9/18/2007-10000

Cultures of CELD1 cells greate in langulatic water hypothesised, wheteel with PD5 and the cells reconstituted to a suspension of Sct0*cells half in PD5. U. (all otices or of elogies cell compensations, each commissing Section colle, were injected autocommonally into the right Similes of Powerk old reads Greate assess (Charles CD), them Charles (Nove). The calculations estallocity divided into these groups of ton animal essels, thus stages at 19-15 days after injection, or when thereon returns reached 200-400 mark.

The time server or interview or the control of the endoated oftoto provide and SEF. The beside were therefored and emagned twing a work. FIG. 15 to a gonglido representation of nature values after exteriorization of the fares 3) successive of authorization for the graph of the production of the extension of the environment of the production VYPEROD carrying the engity veiter PYAJAR was not also to nightly tables to not provide. However, VYPEROD expensions on the risk was able to entitle a

menor growth. These receips description that the combination of curiosimic plant DR2* 20 Secreption the projetomer effect of either the VNIFOMAP compley the PYA2332 vector (ACCR40 8379).

14. EXAMPLE: EXCRESSION OF ATTENDATIONS THE TOTAL OF THE PROPERTY OF THE ATTENDATION OF THE TOTAL OF THE SECOND AHR, plantes there-4 and sportigree.

14.1. CONSTRUCTION OF A PLASMID CONTAINING THE NOCLEIC ACTO SCORNICE ENCURPRETENCIAROSPONDIN ATR.

The popular requires, Tel: 13-49: AVENDER:EXPCTGFREVVALYED (SEQ ID NO:24), corresponding to the anti-orgingenic honorlogy region (ASR) of installment of (see, e.g., Patest application by COIX-44 TE), was truest engineered and order of the contractor in Science of the PARA securities. 35 GOO TAC COC YOU COLC THO TOT CAT CHE COS AAA ACC GOC TIT AND OCCUTE ON ATO TAC GAA GGC (SEQ ID NO:25). Complements

200 mmm

officeroodies (Office 13:46-5 and Office 13:16-2) were produced to synthesize this projects. At the 5' and a suspense cooling for the processing region of CAO'A and an Spei restriction also were saided. Activ 3° and a step coden warraided wate a Bassill Signs a serviced on SIM of the SI

Otico 13,40-1;

10 % SANTAL MARKATAN PROPERTY OF THE PROPER

Placement Traccotto Tacato Accade Stata Accade 1970 Co. 27)

15 GATO GOACAGO CO CAGO STRACGO COLOR STATA ACCADE 1970 CO. 27)

(Plastriction sites are italiciard and the Chapt processing racegniting the istendictional)

142. CONSTRUCTION OF A PLANTIN CONTAINING THE MUCLEK ACTION TO UNIVERSE ENCORPER PLATER SY PACTOR & PERTURE (CHORC

The peptide constring of entire acid registure 47-74 of the Commune of platchet Sector-6 (97-4; see, e.g., Makers or etc., 1990, Science 347(77-79 and Johan etc., 199 at., 1999, 1800£97987993) was onton-optimized for engression in Advancetia. The problet, which is depicted below, includes a DEQ-most expensive for initializery 25 activity of TC-4 on CFU-GM programor colls and a charact of healt mains saids which

le the major are unio bimling dessein.

Plateful Factor-4:

MURA AGRICALERICAL FILANDA PLAYAPANARARICO DI QUI CUNYTOQV

REFRUTSUS SER AGRICATA QUANTUMBERICO DE QUEL MINISTERICUS (BDQ) ID 100 283

Cyc G. (Co. 65,66 = major inpuris blesting downin (in bold) DCQ (Co., 54,58) = palebtory entirely an CFU (in progenitor or 0x (in bold)

Complementary of grownies and of 60 pp 194-2 and of go 194-2; were produced to

- 25 -

B/Out rethin

symbolize this popular. At the 3' and a requires coding the the processing region of Compts and a Spoil restriction with west added. As the 3" and, a step codes was added while a Barriell's restriction side. The time object were accusable to provide the decided strended SNA Registrat. After restriction dignet the singuarity was liquide strongles Spelificabilit estriction; versity pTrailed to produce the pissential pTre001-strik. When processed, the preparate produces the first facing PP-4 (47-70) papilide.

Obje P24-1

Olign PR4.2

Population Tracette Cage agreet Tracet and Attention academic Country CAGGITCAGOCAGATTITGOGGCOATRESSESSESSESSANISSANISS (SEQ IC NO.18)

(Restriction sites are interested and the sample groups of properties and an interest and properties of the control of the con

143, CONSTRUCTION OF A PLASSIES CONTAINING THE NEGLEIC ACID SECURICE ENCOURSE APORTORIES

SASA DOMONALINA ENALÓN ATRAMONACION PADRA ACENTA ADMACENTA ADMACEN

WICKDTAYPELASPLETTRILOGRAYSCARPLIVECENSPARTDARK (SIQID WICH COLONY RECOGNISHMENT AND ALL MACHINET STRAINED TO CREEK PROVIDED TO COLOR (STOPE CO.)

WICH IS one, are, interpretated Profession No. WOOD STRAINED ON CONSEQUENT, on the C.

temporar of reading within his approximation for complete on the color of control of the color of color of color of office of one of one of color of

Signal acceptations will review whiched. As the 3" code, a stop coding year added while in Branch U. manufators stray

10 Olign Apond F: 34 again white playstering ATATACYCCTTTGATGCTCG-Jf (SW)

Oligo Assunda: 35 ray against TACCIFICCE AGOCHIC TOTAL ACCTOR OF ISSUED (D

(Reprolection rates are italicated and the Gorges processing recognition site is undertined.)

900 (1/252/1

PCY/084013242

A financiar of this correct stan was obtained by PCR using placewal CPPA as template. The PCR protect was currely applicated framefor and figurative substitution from the contrast of the protect was currely applicated on the protect of the polarization of the contrast of the polarization of the contrast of the protect of the polarization of the

1 Med. ADMINISTRATINA PROPRIETA PRODUCCIO DI VI GA INVOLUZIA E PROPRIETA PRODUCCIO DI VI GA INVOLUZIA DI VIGINI INVOLUZIA PROPRIETA PROP

15. EXAMPLE: EXPRESSION OF A SACZERJOCIN FAMILY MARKET BY ATTENDATED TURGOR-TANGETED SALMONTALA

This waterpile chorosostates that attravated turner-inspected bacteria, such as Solutionalia, contribing a matrix and amounting a bacteriate family manufact are cognishe of expressing the bacterious fundly manufact.

SM. CONSTRUCTION OF COLUMN PLASSINGS

The planeted observation between as distances compared or specific worked most call to be under the planeted observation as well that a paper on the case of conductors of this is the same promotion seed conflicted or about the conductor of the

- 87 -

WD-01/2009

PCENERO11242

15.1.1. THE BRLEWSTELLS IN TREASEDIATE YECCOR PLASSOR

pic. America I requestres the instantables recognized to create a casteen our stepling a recipie of carrier and back fragment for observables less the placental recipi Collis-CA 38 (SEQ air NO: 34), To Buildeste for closing of BR2 into R3, SRP was fine 5 cloud onto an intermedian charge veryor (FIG. 21). This sector comments a fact diagrams which can be seed so refeet obserp as in twee is a home in a state with a straightful (a) to chromosomet hold. The DPP Sugment was then closed into the E3 shamid Steel asia (FIG. 22) as a consens considering the lack orbits complete unsides Statement. The last of Statement makes married to the lack of the lack 10 consuming Est phoenications are residing to determine an alternative (Picl. 23), reduction the that presents of the plantid is peculiably using a bale entry O'egaloy, A.F. and Guinga, B. "Metibods for Southting Collisius and Waris Planetics" in Planetics, a Practical Approach 1987, ed. By K. G. Hardy, Glisse, L. et al. 1985 J. S. 3875-3889) This makin very shockle shollicute not only the cleaning of MRP cuts the E3 piecesid, but any DNA first could id to contribut with E3 or EMPRY. The new SARDIT players was then transferred but 41.2.9 and remail for activity. Prolimentry hado forming a surys decorrectable feat the presented of their process of their or the presented did not interfere while the aboutty of this senior to process. BS. To determine if 41.29 EVBRP had enhanced salinity over 41.2 9 GS the associal of looked well on 0103 produced by each stant was determined (FVR 24). 40.29 EARNER 20 greatures 100% more bedust use'n from 41.25 23 above, deprivativelying from tale strain ton an adensed schooly over 41.29 ES elben.

HALL HALOTSTART ASSAY FOR BLACIPUTY

The amounts was reviewed (EEZ) to agree that CO_E (and C.C.) con based and part and the control for action of the control

eith, the scoretal valid in children our end halls for bacterial order contained in the bacteria.

- 88 -

been, bring them these consists a cheer rows or halp. The class of the balls extragrammes the expense of colicin securited. The worlds shown in FEG, 25 shown a number of station. No Indos are ever chestoot mound seeks and countrying the vol23-CA38 photoid. In the abstrace of inducation, collision is pendicted by the Subscients strains. Also evident in that wish research hyper of endustrons (i.e., all planing agrees, UV light, X-rays), all of the balos storeste la tire la cidoso-dependent menero.

1513. OVERLAY ASSAY FOR SELECTIVE EXCLUSIONS

Transferences are plated with vectors deletions (up to 1:16,070) care LB and grown for 2 tours at 37°C. Thousandine sourcestain is then proposed at share in the balo 10 sonly had an exceloy poused wide exit ages. After allowing on subject for 10 substants, the gints on time invented and tembered oversight at 37°C. Small extention was size appear the following city (which exempts besteriophings plaques) with a credit colony (or erdonica) le éta mieste of the eferme zone

IS.1.4. "PLACET!" OR RALD PURPPICATION ASSAY

The small culousy at the center of the cleaning zone an the overlay was described phone is there invisted union a sterile governmen physics. In the cases of exists no elitists seeling: or for the case of multiple colonies in one hato, the paths field is plotted with a sectile postque pipe tig. The colour or hate at excellence into 180 pl. of LB. Dilotions (up to Ecolopide) are trade and replaced on Elegan and allowed to grow for 2 boson ec 37°C. An Country is their pound with the statement state as sufficient above. The following day, all or rount of the colonies ments been belief around them.

IS. EXAMPLE: ES INDECTION OF YOUR AND
DETERMINATION OF THE PERCENT
DETERMINATION OF THE PERCENT The following corrupts demonstrates the returnion of the cotto-CASS phoesis in Salmanosta en uno.

Hotelayer since of terror and fiver from two more 30 days yest injection of chines +1.39 (or 41.2.583-CA36) were used for the smaller, in the description to findow, La Liver, 30 Te-Tortoc. All four here genates trensphered for CPU-set outstakes were plotted for analysis by reside PCR and for collects production. Alumn pure collects of collectes standard. to 61.29 were obtained from all premagaratur. Fire collective were picked from each for collects and PCR confirsts. As additional 50 collectes recorded from the 41.20 EET most by places for further analysis or linear record to be a mixed population of collecting profession.

35 one non-producers in the 41.2.953 librar layurgement. Based on these courts, we additional 160 colones from 41.2.953 immer and fives were picked and tested for colonin prognation.

-

CCC/CS00103243

and make INCR. Distribution and plantiderination was calculated from the combined

The counts of the ID bejorates in wise, Determinable of the Process relations of plantable Sciences in an above below in Table 3.

. Tabte 3

	Tistor	CHUMA	Litera	СРФум	provider postave the collection	K-positive in maki PCR	% placerick resention
10	41.29L	1,076+03	1.33	4,026+03	6/5	100%	x/z
	41.207	1.260-07	0.26	2,428498	CUS	100%	m'e
	41.2983L	1.155+64	2.34	2,465+04	82/935	109%	844
	41.29837	L05e+05	0.33	1.595+07	134/135	109%	99.36

To order for the cases planning to the name of the strip, seed to order for it to usury other gastests that are called a series in which, the cases a possibly abunded acres to effect riverly remained to seed. The present orders are grouped upon a decay are consistent as the series of the cases of the

17. EXAMPLE: TOMOR TARGETON: OF VARIOUS 11.29. STRAINS IN TORONS LUNG TUNKER MODEL.

The following experiment decementment that the shiftly of 41,29 on E3 and 41,21
25 on E3 E22 and 41,25 of 51 ER Pen (modified EXC) Software in attribute to target human

The Schemelte works finded by 20th 4 values were ignored to \$40.5° by growers burning which is defined were another finded by 20th 4 values and \$40.5° by 10th 4 values an

- 00-

PCY/CER014124

	Grece	Scrien	Torov(I) Live:(L)	ofc/g sittes	Ratio (Tunner)./very
		41.2.9/23	T	. 5.141.5x16	£3J:1
5		41.2.9/23	L	3.9±3.6x10*	
	2	TI.Z.STEEP	17	4.6±2.7×10 ²	209:1
	2	41.2.9/23BXP	L	1.241.31NF	
	41	41 2.9/E3068°	_ 7	8.560.15x10*	50:1
	97	41.2.95396P.	- L	3,903,6110	

Protes Science And Associate Andrew Protesses Andrews of the p.Codini 1 Marine M Usednike Catalogy and Grass Capita Serve Marines Andrews. Applied and Stretchesses as Microbial Lagrania, 44, pp. 252-2549.

IR EXAMPLE: EFFECACY OF GLOCOLES ON CHARGE COLOR CARCINOMA
The following craspin demonstrate the shipty of 41.2.9/Colifs so in faithful

Coltan \$4 territor fragments (Excluse cases) was implemented in CS TORLES makes ture 9 works) schours nessely. After turper volume reached to 1,000 map, the n bende) samuegast Russe odni dua Lan accidinos alenda volum aviet urb sandi tost And a many fragmentall, and repeated shore procedure for S system. The big was haptered ton neith substantaneously on the right flenck by units g a tensor into mostly in they ded waster implicate.

Advante vice resistantiant on Day D of Superiorite administration when reservables exactly 100-200 may? Present stacks of 41.2 year 41.2 9/C (1929 very based at 101-200 may?). Present stacks of 41.2 year 41.2 9/C (1929 very based at 101 preprinters, and dished in PES in a first concentration of 7.0 x 10f others). respectively. Allows of \$1.2 ml instrint expression (1.5x b)* OF birecuse) were

Agreement, companied on the state of special policy (LANY CATVANCE) were sharing and statement only one indices as special policy of the charge of such and the statement of such as the statement o

WIND IN COURSE ov virtuoninen (CoSS) were disversed and prevented for determining the and retention of plantid

shows in FEG. 26. The data deceanations that more increased by interropous bejection with VVIV20009 (41-20) are of its to significantly inhibit the growth of CSB make color ownerses. It wildfast, when more were trested with UNETROUP expending the CoTES

early stants regressive (i.e., tenners were smaller at the end of the experiment distribu for beginning) was address?

19. EXAMPLE: APTI-TUMOR ACTIVITY OF VERTINANCOLES ON DELT HERIAN COLON CARCUNDEA IN NURS SUCE

crates the orderest skilling of Spirometic means VN9 20085/Cell 3 (41, 259/Cell 3) to highligh the growth of OVLD4 bankup colon persistents selective to Statement's requires 41.2.9.

DLD! cells grown in log phase were removed by bypolohisalism, weeked with PRS, 28 - and strommitmed to South* cellinal PDS. Shaple out hardpointment (0, 1 mil) wore highested into Note more (thinks CD) thorate, Ages 9 mosts; Both Cherles River) authors assessing on Day's (5 x 10° collections) stright Back. The private were need in each group, cardemiced and sugged as about 10-45 days when transcriptoplemention, when transcribes scatched 700-40 kmm². CFO of Selescocke workers 41,29 and 41,290 child wore coursed 25 over day should Burnama (41.2.9 and 41.2.9/Colff3) were dijusted to ix 10' CFD/bil. Abertage

of 0.1 oil between suspensions (0x36° CPERsonne) were lejected suspensement isom spice on drys indicated. The becaris empsector was diluted to 1830 CPU, placed carb rises (COst ou walk) places and the places intelessed countries. The bacters on were christical most day. The surveys were energying emige per winds.



ractivity of 41.2.9 Colfil on 24.01 hours solou curricons in most rates are shown in FKS, 27. The collisis E3-conscious 41.25 etcoin

-92 -

(200)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

slaves extensed activity as compand to stale 41.2.9 cions.

20. EXAMPLE: REFERACY OF \$12.0/COLKI ON \$16 MURLING MELANOMA IN COMMANDE

The following assumple demonstrates the obings of Supray valid marines 41.2.0/Celts: to inhibit the grouts B16-F10 stehmens. 1316-F10 cells grown in highland were reserved by expedientation, washed with

PDS, and accommoded to 5 x 10° collised PBS. Stagle cell suspensions (0.1 m)) were Lejected Stree CSYDI./6 traine (finance, Ages 9 weeks) automissions used on Day 8 to x14 cell forcess) of right Code. Test authoris were used in each group, and stretcerized at day 9, whose hence well-nece reaction \$50-200 mas? Frances appears for Surveyandia objects \$1.2.9 10 and 41.29/Collis were thereof at seem immersions, and othered to PBS to a final

consensuation of $7.5\times 10^{\circ}$ claims, respectively. All group of 0.2 and becomes in the properties (1.5x10° CS'Ultroome) were administrated benames only into raise as group andicated on Day 2. The burners composaion were effected to 1x10° CPO, plated an mobil processes. incurbated averaging to determine the parabox of bacterial city relich were administrated.

15 The turners were inexperted twice per work up to the end of the experience.



The results of the offercy of 40.2.59 Cold 3 on B id remine realisation in CS7BLM takes use allows in PiCl. 28. The data-demonstrate start wice benefit by summaring 25 Injection with 41.2.9 (41.2.5) are able to algorithmatic matrix the grouph of \$16 most unismoves. In subtituoe, raiso transed with 41.2.9 (Co/R) showed a significant decrease in RUEN/ 650 of early since points (ep.to-day 27) compared to 41.2.9 slave. This finding is very introduct because resilier have state are except southly succeptable to other the aprentice (e.g., chemochampeusic agents and packation such as a cape).

21. EXAMPLE: ANYLYTIMOR EFFICACY OF CLASSIC COMPRISE STITLING

The following example desponstrates that the encopyrection of Bill and III in Substruction seasons 41.2.9 increases the anti-taxon officery of ensists. The compression of DRP and BS in Sciences to region 41.29 incomes the minimum of \$33 received from the business system. If HRP were oble to increase the secon of E3 secreted from the Summedia in who then it could be bypothesized abouths

WD Issabb

PCVASSUILING

additional measuralitator (2) woods has readily awaitable to the neutron with took their impresses the cyromaticity to shope odds. In additing administrating process of authorise (16 millionise per means) were project.



This would work this coupletine was the brown bing, estimation than 1781 TH. That shall be seen in place and the shall be seen in the shall be s

15 contribuy both SS and like? In read to this smaller, the and statum officers to further only creed (67% inhibition compared to understand enough) and the emberood (coloritor in quito nignificant as the embiror since points (Table 5).

39ah Dev ! 7	10av 28	D±/26
13.9 30	38	40
11.2.993	58	143

To exact letter, reasoners with Anhancello carrying both the operand coefficing R3 part the enthroughter sales agreem (BMP results to an increase or an incorpress efficiery entry good to the memorably control and to treaspose with 41.2,970 physic.

23. EXAMPLE: COMMUNATION OF COLLOW RS-CONTAINING SALMONELLS METERS RAY VIEW THROUGH

The difficulting example descriptorates that the countries states of 4.2.9 with two desire of X-ray appellication in terms of the extremel that of name theore that name for X-ray states. The destroic war as the littles and daily of humans were implacted by the order of the countries of the coun

36 Sect, of FDP C5756 Result twice (5-7 with off age). At day 6, edition T3-correlating districted 41.3.9 was adjusted and an days 12, and 25, 3, case were administrated.

The straits of the eccel

beatroom are shown in Tuble 6.

en selectivis Ed consulving Salamena with a cay

	Yabto 6				
	Сукевку	n=()	Days to Ug	Jetico	70'C
5	A chaos 15Gy	(6)	12, 15, 18, 18, 18, 21	27	1,0
	J 19Cly svrays 12dps, 26dys	199	14, 64, 18, 21, 23, 35, 35, 67, 67	33	1.9
0	K 41.2.9+15Gy Armyst2dpt, 2fdys regression #1,2	(9)	21, 28, 35, 35, 56, 60, 59, 60, 67	42	2.8
	L 41.2.9/83+15Gy 1-szys 12dys, 26dys 10,00ession d12	(9)	28, 39, 53, 56, 56, 60, 67, 74, 76	57	33

This date disconnective that the combination of 4):2.9 with two disessof X-ray utilizantly interesses the survivantians of raise above that seen for X-ray alone. B3 flather increased the nursion fine of trees above that you for al. 29 plus Noop.

21. EXAMPLE: EXTRESSION OF CYTOTORIC MICROTIC FACTORIA BY TO HOUSE TAY BEACTIRE.

The following example demonstrates that the exposation of F cost epocessio scoro fin fluctor I (CRFI) by fourter singuistic learning.

Oyneconic sources factors learning but are not firshed so, E, carl explosion mentals.

- Operands automaticaministration, between the timed by E. and representations are stated (Conference and Conference and Confere
- 1904, Post. Acad, &cl. Tilka 91:3884-38163. CNF1 was object from E and 193 (ATCC 700136) by FC3, using the primess (forward) 5'- OTGTCATOAAAATGGGGRAACCAATGGCAAC -3' (45Q ID NG-35) and GENORIES - CACAGAGCTODOGCTAACAAAAACAGCACAAGGGAG-1 (SEO III) SOUTH AND A STATE OF THE STATE
- extended modula at the Yale University Kock Bistories day leterator. The DNA

9/0 (Luday)

securating confirmed that the closed PCR product was CNP I with only miner augrepor enciation of 6 of 3065 base pains.

The CNFT observed was elsest-proceed into an \pm co5 DNA of thing boss DF15x and Salmondia proin YS1646 (instrumental Publication No. WO SI/1300). The expression of CNPs was determined to the Z cost DNA closing limit and Salmonthis strain YS1449 using a standard LDH appry (Preprings, Madison, Wi, Cytopes 1969). STG. 29 closes that

the process of the CNF-combining planning route in educated extensions. A subsequent acres were used to show that Schwarzife carrying the CNF-contenting at estionment servi vivo (selle M autor upp commente derrying prax i re-constituting in manus also establish dest instrum proposition of COPE under a softististisation (Syptish et al., 1981, 3, 1 Clin, Salproble, 28; CoP-CoPF, Eithe actis crypted to CNPI instruction activism for smaller by light interconserv. The autobilit in 1001, 18 debtyly leave to its integration of COPPs in distinguishin receives in (st. aspected meritamistississis and cell politoprocess.

24. EXAMPLE: EXPERISION OF VEROTOXIN BY THROS: DESCRIPTO PACTICAL

The following communications the systemicity of variousle AB quede 15 towns largered brokens engagement or approximate approximate the systemic AB. Verptonin (1972, 1197.770 toxin, Shiga mura, shiga Nice toxin, Shigarito ranks). This

toxin was landered them a collisin-producing E. coll statis \$15010, and one conjugatity thought to be a collecte (Parker-Minuley et al., 1996, Perc. Natl. Acad. 3of. 92(15):5956 7000). It has a long history of resistance authors, especially for evertus owner and trans terraces, however, the perintures activity at especiated with purified preparations, not police whole live becture.

Venetocknows abused fixes in not \$100 (16/ATCC \$5227) tuting enterest based upon the published sequence for supervise I and evaluated by DNA expansion or the Yahs Kenti Biscontocking Cester upon standard DNA sequencing scalarings. This

York Meal Belowshoodings Control upon a market DNA respecting unsurgers. The Compression of received was recognitized using the Big plane wede count of and strings/color-leads by presence polyodromic with the removal at Aud 3 majoriths. This settle-profile-leads with EST weareness AB was aloned here a vertex for chromotocom. areg Grien on your nonergone

24.1. CONSTRUCTION OF VECTORS 2424. AMPLETICATION AND CLONENG OF AB Ventoxin AB (Alif vor gormand by ICR neing the following actuary:

HISB/S RIVERS SOFTOTOCATGGCTARAGCATTATRACTAGCTGCATCGC-S 35 (SEQ ID 100-37); v.d

QSTX-R1: DAMES FATISTICKSCAGAACTGACTGAATTGAGATG-FGSBQ 6D

There printed also countin owner blood(3') and Pati(3') restriction and resolution that for clearing into the Nicol and Pati alter of por 50%.

24 1.2. AMPLIFICATION AND CLOSING OF TETERS

THERE AB was contracted in the instruments were party-forms. Tourse was guidented by PCR value the following primers Tours forward 5-OPCITAGATCTTTAAGACCCACTTTCACCATTTAAGITC-F (MSQ ID NOS9) and 18 INFTECT: TOTAL SCIENCE SCIENCE BEST TOTAL ACCORDING ACCORDING (SEQ ID 1000). Times referent screens Belli(F) and Bentifi(F) statistics extractions after for elouing into Bgill and Brack! sees of pSP72-F6786 vector.

24.1.3. SUBCLOREGEOF AS INTO 16877-PERSONER

payoffA. AB was digested with Bassiff and down serviceing endoacolosses to oprove Aft the lacerates into pSP72FARE-TelBEP, also depended with Bessell and Avai regricien audioactiones. The pSP75F6/86 were returned multiple merketer exercusations since for elements in adultum to a particular the Proprie game for the Public and the Resident examplementation in trans. Such the vector (pt07276-226-Tot18947) and the AB meter vector (pt07276-226-Tot18947) and the AB compromensation of Variat, becomes record person accounts just the Art what the trooblest and 26% (XTAE agrees gelvest published stilling file (Region gel despotation). May They extent and listers never ligated using "Filipper and eventiferated time DELFA" and being it in both actival trailled. The next went getted to be please contributed to special Arting and 40 paghot X gal. Positive extension were reduced bread on ungit tills existence. and the prosence of a functional fi-gal gear (posture rotation were blue).

74.1.4. SURCE ORING OF TELEST-AS INTO ACRES 2 pap 72PG/RA-TerBRP-art: was digented with blood and Bill contributes and

the palestoning into the pCVD442 sector, also digreed with 19oft and \$15 sectoral pa

14.1.5 MARCHINOMOROMAL VACTOR

99/1903) was constructed in the activity were of VP-02 (Dominious and Kaper, 1991, labority and language 99, 4340-4347). Princendor TCR verse designed for words. ganazate profices of the 5' and 3' method of the mobil deletion contains in 1992/2009 or two separate produces (model-3): Revenue 3-cotto 10A, OCT COG 1 CA ACC AGO AAG

R/D-01/183872

(Y) (CB66+3324)

OOD TA ACCITIC THE ACCITICATE THE MONTH of memory and TROT OR ACCITICATE ACCITICATE THE ACCITICA

10 (2012). The sevens in ordered in a pOPOP-bland (b) or TSC 1710 of 736. Bed often in order in Accessible of large and on the Section of large and planed (COV) of large and provided and large proprieto 1013, very position 4 of 1 popular planed (COV) of large and provided and large proprieto 1013, very position 4 of 1 popular planed (COV) of large and large popular planed (COV) of large and large popular planed (COV) of large popular of vicinity in the section of large popular planed (COV) of large popular p

242 TRANSER OF THE CHECKOGOGGALLY INTEGRATED CONTRACT AS SITO 41.15 (181646) 70 OFFICE AND THE STRAIM AS 25-16-REPLATE

30 Miles Institution Park Communitation (1994); Device of al., 1990, 14.29 was reconstructed to confrontifite invaluation using sizes in VSSINGET. ON SIGNAR and some, in the printees of 26 bits and pointing sizes them (27 CVPT); other coftes industrial of a cost² (or may) and make described 1.29 pc (TVPT) inteREPLAND vision contributed for the Browlind and Emoleth Confidence and and Emoleth Confidence and Signary, six, position 4.23. Position 4.23

- 25 -

9/00/04/80

agent (PS, 33, 44) county that the LB measure right plots were that is related to the ABCA, and the plots were incohered as APCA. After the proved or devolved as contributed to the provided of the contribution of the provided and the provided as a contribution of the contribution of th

PCR. One push derivative exminsing the disconnected integrand reserved as highereness sensitivity and embergentia netherate was deserved as 44.2.5- Tet-BRPreconstruction. AD.

1.2.5-Tex-B2P-recursors. AD was sensed thropsocologies of select and extended to a select and extended to the select and extended to the select are above to 177.3-3-, demonstrating the total properties of recommendation of the select and the sele

26. EXAMPLE: EXPRESSION OF HEMOLYSDIES TUMOR YARGETED SACTERIA

The Nationing example demonstration that tensor-tengrated better in our to enganessist to experience to expert tensor-tengrate produce such as tensor-tengrate constitutively or a substitution out on the constitution of the substitution of the sub

30. (Optional Record DOCT)1955 is by primaring emitty in Doct in most which is not which is not executely copyrated Record Re

27 XOCIDA-AAG (ACTION) GRIQ (IN NOVIN) New York of the year Confirmin 1919. Year Uphersity at an of centre brack Cones was manufact 100 contents. The CRIS product of the countries are very almost date and mode and delateff to less of provide (in terminally New order to judicial to supplie on the interface to your partial product and used to the provide operation with order and how the coloural facility or the probable dates variety effectived peoply or with shorted and how the coloural facility. The confirming the product place of the provided peoply or with shorted and how the coloural facility or the colour facility. The colour facility of the colour fa

3 Datts. (Complete State St

Connected to have formerable inches to 1882. 35 (3.4 and 28) for the house construct, whose a half o is observed with our without added conservation. Petrocycline.

99 •

dependent late Secretion is shown in FIG. 55 (3th and 316) for the telescopies-prodriven Shed, witten no belo in channed without the addition manayelies. These room patrials that a record-inspected becambars one express a bosoniya's protein, white: hvely or ansign inducible control.

26. EXAMPLE: BEFRESSION OF METHERINASE BY TURIOR-TAINISEED BACTERIA

The following example dynamicated that alternated tracer-targeted to North im 200 fé da s'experir Cor Cografic vorté quinz, au expension crandas acid 1904 foi in 1907 granda. Adminstr donc describos for administration of publica

methicases to inhibit turnor grands on to administer a DMA or viral water which sodies for gradulerum (International Indification No. WORDQ9589 by Xmand Ten). Amand The did not displace assistants for using numer equal tile becomes sectors for delivery of methods st., And, in series as arthorn efficiery with purified protein, buyer emounts of outbiouser mo required. A social method fits delivering nurthlessess discretly to the research is to express the

ne uning transportage and bacomes, The following printers were gen upon Ombesk No. 543133.

Forest MS76-XH09

20 SYCOGOTOCACIATOCAGOGOTOCAACAAGCTOCCA-3" (SED ID NONTK SID

SVCCCCGGATCCTEACCCACTCGCCFTGAGFGECTG-F (SEQ ID NO.48)

13 Uring the above blood primers (4 unit) and an instance universe of Passatones public as the structure, the programme of materinous was completed by CCR winder for full bloods.

one syste of 190°C for 5 minutes, fathered by 26 systes of 190°C for 8 minutes, 69°C for 1 related and 170°C for 2 minutes. As fixed ampletionists step of 190°C for 12 estates total

50 Sentante of the Section of the PCR recording. PCR products were spectred on 0.8% IX TAE approach a PCR product of the expectation for runkinger (~ 1996 by) was ideasifed. The band werencies from the gel and yearlief owing the Qinger get from

Both, the 95F72 vector and the legitamings? partied arethinness grow citation drove vector diparted with the restriction enterprise Niso I and Bare His. The dignoid vector and and house were resolved on a 0.5% DITAE appear get. The products of the disculture

comproding to the liberated vector and deprint problems gave were control from the got and partified using the Opagen got extraction by. The isosaired vector and the insert (marbitrary) were biguited segretars unleg \$4 Biguin. The lighting with how was unserfaced mto Plade E.c. ii or iis by a from shock rattless. After tensoring, the colle were plated to 1.8 work is containing 160 engine, of popicifics (fing) to select for slove colls vict version for

- under automospi 80 eigheit ist progrissing (kergin) sentich in Stout sich der crossisch aus senting (1921 vonzu. Aus prinstame stollerun weit (weiter) der sich gestreit der die gestreit der sich der
- er al., 1996, Osroer Recreats \$6:2156-2122

27. SXAMMALE EXPRESSION OF ACCOUNT PROTEIN AS A TAT PRESCRED A TYPHENIATED PROTEIN FACTORIA CONTROL PROTEIN FACTORIA CONT ougherered to express and secured finding programs operating any efficient numberale and a florry position carb or TAT, retenseposite, VP22, and Exped POF MTS.

- 27.1. CONSTRUCTION OF TAX APOPTIS VECTORS The concry virus (CAV) promps apreyin in horses to induce apopusit in second selfs, as when delivered by adequiring verying (see, e.g., Noteboom et al., 1999, Orne. Thurston 6:653-8973.
- In order to grucese a greatin which could be emercified in the cytrolisest of Sightpostic and yet itsee the ability to be transported to the nactions of a sense of the cause apopulati, the apopula protein was fasted to a populae derived from the houses insparental subsety was (HIV) TAT potella (100, e.g., Schaumes et al., 1999, Science 285:1509-1972). Size e FAT profess fortices have also been element to be functional wides found to coly-histories (formitism (feet) emisse with which Irok income the positive charge
- and facilitate protein qualification (Schwarzer et al., 1979, agent), the TAT-apoptin festion was governed with and wistous the handshandler (FIG. 36 A and 19). Parther, the TATagreetin Senion can be generated with and without an CoopA-M, signed requires (Fig. 36A
- The appeter out knowleterine appear on extensive uping overlapping of appearing the model of the section and sequence exceeding apoptic was greatered by PCR to be the Atlantag of gueschoolides.

-101 -

PAGE BUZZER

PCEVERSONNES

TMP: 5- GATCCCNTGS CYTATGGCMG AAAAAAAACC CYTCAGGGCC GTCGCATGAA CYCGCTGCAG GAAGATACCC GGCCGGCCCC GTCCAGGGCC GTCGCATGAA CYCGCTGCAG GAAGATACCC GGCCGGCCCC GTCCAGGGCCC

TARE: 91-DEGREAGED CATEGRISHES COCCOGATEC COATGOGGAY
TICGORDOAN TECOPISTIT COMEDUGGS CONGONGSIC GROUDSOONN
ACACGETORA COC-3 (850 ID-MO-28)

TAPI: 3"-GECATOROSI GENTRACAT ENCOTORIC CECCALCOS GUATAACTEC

GAAAACACOS GETTAGO DI NO 51) "

TAZA: 11.GCUATATIOS (IACBOATCOS AGABCETTE TITODACESC GCTTTODOCT GATOSOFICO) CACATOCOGO ACATESTAAA AGCOGTOTT TTOOGAGTA TOOCOGTOCC 3: (SEO (O NO 5))

The satisfies followed working for fundamental continuing remond for TLTA souther falsely present present deep file of PLAT elegenthrosis and Markell of elegenthrosis for PLATOCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON THOROGOCKTON ANALAMOCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON ANALAMOCOCKTON TOCKCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON SERVICE AND CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL CONTROL TOCKCOCKTON CONTROL C

COTOLOGICO V. 1282 (20 NO 56)

Enchedigen scherofet is Emeraturation a dock solveien which is 4 pM in consciously. Using emissed PCR provise intend (Planmassia, Roady-ta-go londes), 2-pl of and adjustationally as used. The PCR contributation intend of consciously contributed of one cycle a 150° first performance of the cycle as 150° for the insent, 50° for the planes, 72° for the insent, 50° for the planes, 72° for the planes.

our cycle at 72°C for 10 minutes. The ACR matrices was then material with

Whousie

pharolikhla odena, procipiaced with minred, redised end to water at it subjected to accretion digestion with Nos 1 and Finel III. The north tipe-ligited PCR product wa propleted by get observationes is and the product of the country size (approximately 420 and 410 bp for YAT-spoplin and Legaliterina-EAT-spoplin, respectively) to se excited from the got and instance uning streeted undepute bookey; forthwaters. There you know me Egyptel into Nico 1 and Hind Hi deposed profile (Plantacin) and that it due pay the ATAT-payer is provided. The accret in Na at poster was a bisined for both for TAT-apoptin (MG).

37) and the localists fine TAY-spostin (FIG 38).

11.2. DEMONSTRATION OF SECRIPTION AND UPTAKE OF TAT-APOPTIN

accessor by standard techniques known in the set (e.g., by \$100 object or electrogorowen) grad agriculted in medium. The puperment from the bacteriel culture is trained for the presence of TAT-opogete string recinations known to those of shift to the set (e.g., Western Bloc unity as or ELEA). Once the presence of the TAT-sports by the approximate of the 15 backets in conferent, the beneath colour approximate a modulate with programitars caffs (e.g., NRH STS, CHO, 250, and 350T caffs) and the pressure of the TATapopular leader to collect recognised by apopular passes from a though of the Tild Mich.

turnor-tempored because engineered to express TAT-apapties or apopular are other interest interest and to a \$16 tapper model. The mice are precised acreast stays effor administration of the bacterin and the organ weights are desembled. These states enough for the processor was invalinated of TAT-suspense or equipments using upopures as 25 (e.g., DNA intering and Fluorescent in Sax Cell Denta Descented Six (Bedwinger Manufaces, Manufactor, Germany I) known as these of skell in the set. Parities, the sine of the terraces and descriped to determine and denser estimics of the FAX-apoptia. Terrains are place homogenium and placed to dressing the colony farming units (c.f.n.).

23. EXAMPLIA EFFICACY OF THE COMBINATION OF WINSHID AND CHEMOTIZEAUTOTIC AGENTS ON THE RESIDENT OF BUT? LUBRI CARCINOMA FIXELY

The following example derecessment that the administration of averaged to nd becards is combination with a obsessificacy said: agent may act synergicide. By or 35 spicital vely to inhibite the growth of mild thromasuch as long externous.

- 506 -

September

PC9/0580/00241

20.3 RESPONDED OF THE CHARMATIKAN OF VARIABLE AND SET OF THE CAN THE SET OF THE CARCONNAL BENEFIT OF THE CARCONNAL BENEFIT.

respect by specify this leg has the SPTU and changed in the Drule of DEADNA changes that the Drule of DEADNA changes that the matching of the left of Terming (1995) 2477, 58 TOL. Age has prescribed that the level of the left of Terming (1995) 2479, 58 TOL. Age in the prescribed that the left of the left of DEADNA changes that the left of Termina changes in the left of T

- and the disting percentines. The same was because the first animation of 20 and of these Sulvey and the same and the same
- 15 Interpretable Fables son No. WO 98/1053). The colonies formed were sourced the next
- The surroup-the C. (Eliza) and represe (Agran) were administrated to state according to State 1, Aghier. The regress date and estimation of the significant to the control according and the state of th
- was greatured review a vector tipe up of the experience. Les view seasons, representer a monatory of the institution was observed elaby. The under were kept in a close, troppendure contains the topicty. The heading was changed to too a week and the celles were provided with enough for eland distribute manu.

ofth enough ford and drinking was Traft 7

[Group	Mamber of Mice
	Software is control	10
20	3 mpt missesyein C, 1 m, day 15	10
	0 style, microsycia C, Lv., day 15	ю.
- 1	150 sept cytosom, i.p., day 85	10
- 1	200 mph colores, Lp., day 15	10
35	VNP20609, 1x16/Annecs i.v., day 12	10

n	D (Uzdar)	PCENTERIORIES
	Gmop	Mornbur of 854sh
j	V98P2018, Int6Yourus i.v., day 12+9 repl: witcopysia C. i.v., days 15 & 22	10
١	VNP20009, b.16*Nutose i.v., day: 12+5 sepi: minonyclis-C, i.v., day: 13-8-22	. 10
	VNF16009, Extilitazione i v., day #2 + #50 mpk cytomas, i.u., day #5	. 10
	93(P10859, 1x10*manya kw., chy 12 + 280 mak comme lim, day 15	10

19
14 A 1500 CENTRO, 79, 600 conditionable management with VPS 4700 CENTRO 4 of plants about 45 of the VEST flag agreement with the VEST flag and VEST flag and VEST flag and VEST flag agreement with the VEST flag and VEST

28.2. REPICACY OF THE COMBINATION OF VAPAIOUS AND CHIPLATTH OR THE GROWTH OF MIT THESE CARCINGMA TO MICE

Waste counted the next day.

The clapholus was admittageed to mice on day 14, two days pur bacterial injection. (Table E. Agha). The cirplain was officeed to 0.5 segred with normal relief prior to administration. The tensor volume was passement twice a wack until the and of the cuprelesses. The behavior, appearance and manufact of the animals was observed delly The spect were loos in a class, appearance company behaviorally. The behing was closed to the a work and the reise were provided with one agic feed and the debt of weet.

Group	Number of title
Control (as resetuents)	, , , , , , , , , , , ,
Vest 201509, Ext (Procupe i.v., on day 12	,
3 repli obsplanie, i.p. qw a 2, ou day \$4, 19	9
V23/28000, x10 ⁵ tropum i.e., on day F2 + 5 grain climitate, lap. gen x, 2, on day 14, 19, 20	9 .

persons the growth of the MIT long carefronn wave than YNE20000 neumans about or rispins's processed alone. There exectly program that the administration of exposured two empried bucteria in combination with circumstanceposeic agent soth at climbing ourse out. 28 synthetically or stablishmay so inhibit the growth of solid hancers such as hop careinous to

The present investible is set to be Trained in scope by the specific exhibition deprint of horse. Indical, unless modifications of the investible is which to these described barrier with bosous apparent to these shifted in the set lines the foregoing description and was reposprag ligners. Bush amolifications are innected to fall will be do reprior to approached chiles. Various subjections are mined forcits, the disclanation of which are

incorporated by reference in shelt enthanties.

WHAT IS CLAIMED 19:

PC1900000133M2

An attressed in our discussed sustains at

- An attrapped incoming good material comprising one or more mobile acid institution cannoting one or more partney different mobiles operably third to one or stone protection, inflored and differential institutional boastile to a floody tipe cannot be familithed accepted.
- 2. An assecumed secon-augusted because comprising one or more sorbite axid usal course exceeding one or release gainest officients enaborated and one or representations of detects real-content operated by the does on one one pursue sera, whereis and attracted another department of bootenies is a facultative according to asset designed bootenies is a facultative according to asset designed bootenies is a facultative according to asset designed.
- The presented reconstructed between 0 or 1, wherein it least one of the primary of bother received is a THP fluidly propriet.
- 4. The information district the term of the first properties of the properties of
- The attenues to man-impand basterin of chica it on 2, wherein at least one of the primery officers molecular is no unti-engingenic factor.
- 30 A. The information incompressed function of reference, in fusion is not incompleted function in the control of reference in the control of the control
- The attornment to sever range end treatmin of claim 1 or 2, wherein or borne on or of the pulsary extreme molecules in a bacustoner Sensity one of terrorists the purely smith the attribute search RICP.

- 167 -

9000000000

PCY/0500125262

- The obtauned hour-fragated hetitals of clear 7, whether the bedderion of mumber in CoR1, CoR1, CoR1, CoR2, COR2, COR2, COR2, COR2, COR2, COR3, COR3, COR3, COR3, CoR19, Cortica A, Collean, K, Collean, L, Collina L, Collina L, Audina DF11, partials A1122, aughtyboocks 1589, buryrein 1923, pportio RI or AP41, segariti: A-216, viluionas, or mirrorib 4615.
- The operational number suggested functoria of claims 1 or 2, wherein the primary effector evolution is a toron invitationy engine.
- (6). The agent treed to two concepted between of claim 9, wherein the intraw lebilistry analyses is restrictionary, expressions, increes, phase photogram, protects, 1944 acres or physicalises.
- The assessment became targeted beattein of chains b or 2, releases the printerly effection restorate is possibly the recombe, CRPE, or PAPE.
- 12. The announced horse-negated baronics of white 1 or 2, wherein the postury effector suplective is dischart from an entering plant, bearing, or where
- effector unalcopic is durinod from an enteral, plant, besteric, or virus.
- The assessment (some-tangeted bostons of claim 2, wherein the reconstrucalizonermotorule is universated candidately agont, an auditocours protons, a proving examining graphics, as exchanges protonomy, a riscopping, or 30 autigns.
 - 14. The extensional number targeted backers of oblian 1 or 2, who rise the automated acceptances descens in Subscription
- 25 I.S. The approximal associated become of glass 1, wherein the approximal tumor-imposed bacteris fastler comprises as calculated colored system.
- 36. The attenued square-targeted become of claim 2, wherein the according official recipiests is a control of referent flower (BFP).
- 100 FT. An otoressed dubon-targeted basteric comparing one or note mobile acid especially associated extending one or note the mobile acid especially fluided to one or make provider, was taken and attenuated target especially fluided to one or make provider, was taken and a tenuated target especial baseaut in a fluidative very sor fluid especially experience and and display provide comparing support agreement and an attenuate modes in.
- 36. If. An extension demonstragend broads comprising our or man model acts molecules encoding one or more fusion protein operably belief to one or more protective.

- 100

SALTERNA CONTRACT

PETRICONNESSEZ or ar floodusting arounding

- and take Swiero provide comprises a there particle and so afficient evolute.

 19. The attornated supportunated accessive of claims 18, wherean the fusion protein
- forther comparies a signal conjunction.
- The attenuated econop temptral features of chains 17 at 19, wherein the wignel arrangement is no Octopia-like protein.
- The optional monocompand between of claim 18 or 19, wherein the flow)
 positive is derived from the HIV TAY proofs, the assumption is reproducted the control of Kanasi Abrodient grown Besser (MY) resolvents mendenting requires (ATS), is neglectly required to the MYPS, in the control of the MYPS.
- The administrative networking the factor of these 19, 16 or 19, obtains the official analysis is a primary or according affector contents.
 - 25. The anomalos removary pool besteria of claim 17, 18 or 19, wherein the constraint for construction for a construction framework induces include constraint or or most author real welcomes empeding one at some officier molecules againstly flavor to one or more premoters.
- 39 24. The attenuated autonomoganed because of others 23, who note that effective modecule is a primary or assenting effective sentencia.
- A pharmacoules knowposition orienginizes a plasmes readinity acceptable confus
 and a autonomical deserce neighbor benezies originizeng raw or somet modele under authorises
 exaceblag one or somet primary effected another expendity Tillheit to other or review promotion,
 where it is said case restail according registration as a familiarity a section or familiarity assection.
- 26. A plan consoliable inspection receipt of the sale between the control based and an encounted based receipt of beautiful sourceful of one in more matches and another seed excluding care or more primary efficient antended and one of these processes operably bifold to dro or some promisers, relations and one of the same processes of the pro
- 35 27. The present according compensation of status 23 or 26, when it has consolider privately effector mathematics is a 110% feating member.

- 109-

WORLDER!

PC9008000341

- Theybourseed at isospoiline at faith 27, secreic for TPE finely enclosed in terror (course) favors (TPE-1). Place and the terror (course) favors (TPE-2). Place and the spots in the faith of the faith at the second of the faith of the faith
- The phiermaterial composition of claim 35 or 36, wherein at last one of the galaxies officiar to observe is so national openic letter.
- 10 N. Tie phenomication recognition of the 20 variable to an adequage of the color sections, specific of the color of t
- 20 The grid measuration prospections of chains 25 or 24, wherein at least one of the principly affector profession is a best raise in the grid measure with, the province sold best schools.
- The phenoscousier1 composition of white 31; whithis the haractics in family
 the matter is CORT, CORTA, CORTA CORTA, CORTA, CORTA, CORTA, CORTA, CORTA,
 CORTON A, CORTON E, CORTON L. CORTON A, CORTON DP13, position A122, resplaysoned a 250, better to 742, process A1 or AMN1, respects A-216, visitation or extraction CORTA.
- . The pharmonounded composition of this 25 or 26, whereas at least one of the $_{30}$ -pairs by 450c for medicals in a tensor inhibitory empires.
 - 34. The phaseneousled composition of claim 33, volumes the state exhibitory entry as analytoness, accompliant, Equat, Phaseletters, potential, DM into a physical state.
- $35 \qquad \qquad 33. \qquad \text{The pharm contical composition of than 15 or 26, whereings been and of the prince of finite rank time is be unduly in, wentering, CSSF4, CSSF2, or Poll.}$

- U9-

With displaying

PC SCEED (1926)

- Tang harmannesinal compositioned chains 25 or 26, whenth the pricessory effects substitute is decired from an orbital, plant. Netptig. 4n visus.
 The prior remodular decired from the pricessory of the prices.
- The promonuncial composition of chine 26, when in the reconducy offerior
 and/orate from a percelolating gages, an anti-ment primal, a pro-dwg converting empires,
 as actioners molecule, a obsergme, or ne emiligate.
- 38 The physical ecosposition of civilin 25 or 26, wherein the openium to transport agency because it is a superium of the contract of the c
- 39. Whe pharmacountril acomposition of object 23, wherein the encounted incommunication in the interpretation and entire system.
- The phasmapesseed composition of claims 26, wherein the associatory offestor aminute as a bacteriories release factor.
- 12 41. A plumacioni o compositio de compositio programa programa de la menuta de attenuados formos compositios compositios que en esco acualdo está moderna creación; que se e anno fisacio presum o prambigo listerio se en esco esta compositios que se en esco acualdo programa de la formación de la compositio que se en esco de la formación de la compositio del la compositio de la compositio de la compositio del la compositio della compositio della compositio della compositio della compositio della compositio de
- q2. A johannamentan vaajaalihkuseeteentiises johannamentailija vaajaaliksiin saati an amensaad atuori-teopatal bastoris compositelija van et maen totaka saati moterritas aasalas, on eer muunos kalais pootaa spormily laakin tii mae ee muuno poisentus taleenta sakit aasalas muunosta saati muunosta saati aasalas saati saati aasalas saati sa
 - The pharmacouli in become all time of the involve the funion point in Fabrica comprises a signal enqueure.
- 39 44. The phenomentical composition of claim 4) to 43, wherein the classic construction of Congole Liou protein.
- The plantar united sympolium of claim 42 or 48, wherein the fury postillar
 is districted from the 1817 TAT proties, the autocomposile basecoloscole (gaussiantis), Napole
 Sincoloni grands inches (PSS) are also memberally posite too (NTS), beyon sheet a visit

 VEZ2, benefit incline, prospires, or humany-plane

.,,,

D/Date (1974)

PCT/0004043341

- 46. The glummanus(a) scappedrum of elajor 41, 42 or 43, viscosia the effector reflective is a privately or consulary official resistants.
 7. The plummanus of manufacture of their reflective of the reflective resistants.
- 67. The pharmacerical congestion of claim 49, 42 or 45, observe the afformation business depends between depends on the first paragraphs can be not the indicate a claim of the conference and control of the conference and confere
- 44. A restord of a filtering on or many primary efforce reducing the fact transmiss of a wild more cares to a sight in such of the other transmiss of a wild more cares to a sight in such of the other transmission primary in a sight in the other transmission of the other transmi
- 60. A mathed of a dylaming conversement principle of the converse and one or overselves and one or overselves and one or overselves and one of the converse of a real time converse or a section of a mathematical production of principles or overselves or completely positionating a phase material to convert design and or operation and overselves or other operations of the converted of
 - You ensured of which 4th or 49, wheatin at least one of the privacy efficient motorists is a TMF fermity procedur.
- 25 Ji. The sucher of edits St, whenic the Third Roubly combor is store as much father of the St, bears reconsidered edited in Third St, Third and substitution in Indian placed (TRAS), Third and substitution of policies (TRAS), Third critical world induce of approve (TRAS), Child (TRAS), Third critical world induce of approve (TRAS), Child (TRAS), Third (TRAS), Child (TRAS), The ST, Third (TRAS), Child (TRAS), Third (TRAS), Third
- 30 50. The custod of obtain 48 or 49, wherein at feast can of the privacy affector spotcosts in no past-engineer's feator.
- 53. The needed of culter \$2, wherein the articlespine factor is understood, and cultivative production and experience of the additional and the additional content of the a

-10

SID BUILDING

suppopulation and could be greate of plantals florenced, lateratives program in the residence of the surface property of the surface property of the surface property of the surface property of the surface of the surf

- 54. The control of charp 45 or 49, whereas at heart was of the pointary effector molecules in hacteriorist family receiver with the grovino and backerbook is not BRP.
- 55. The method of others 54, wasseln the best visuals family exember is Cottil, Collisto, Califol Collet, Califol, Cali Eurysteen 7421, pyrania 1k.1 or A.D. 41, savegacian A-216, wholestin or microcia billis.
- 26 The method of claim 48 or 49, wherein at least one of the printery effects: anciecules is a runner intravieny conyune.
 - 52. The methode foliate \$6, wherein the square inhibitory conjunctional diseases. оприсорівант, Крам. у t одлікії разв. дкомата, Віналер от діуствілан.
- St. The medical of classe-46 or 49, wherein at least one of the primary effective Nr. 100 accepts to take to the report of the control of the control
- 59. The carried of classe 46 oc 49, wherein at least can of int printing officers molecules are derived james existed, place, bestices, or visus.
- 69 The mighted of claims 49, whereas we least your of the exceedincy offictor malecule is an anti-neural protein, a pro-drug quantified altoyria, on anticops recolucule, a PÉROCETES, OF AN AMERICA.
- 64. The method of claim 48 to 49, inhania the anaromed terrac-appendituous th
- 62. Taxantichofcialm48, who elethorstrough times surprisely factor farther сопределения опривоне добого сурбую.
- 63. The medical of chains 49, whatele the countries officers projectic is a temperaturals release factor.

-112-

- (4) A marked for shiftening one or more finish periods for the statement of such them country to a telephon for such them country to a telephon for most of order too more appropriate, challed forms of a polyment of the such that the such one or eace fusion: postains equabily liabed to one or more processes, wherein und attenuesed tensor-largested features in a thousance search or facultative searcher and and feature prosides computed a segnal conjugators and an effective motion of the color.
- 65. A received for deliveraing reas or more fiscious provisors for the treasments of a solid assert exercise to a relative to each of each intermental, potentially attributed to the provision of the provisio phases yied augus supported beautifus congratating one or earn as choic poid protocylos empolétiq pure or autors flusion processe operably limited to don or come p-securous, wherein said articulated numer-expand bustons is a floatistive acrobs or bundariou accretic and said
- 06 The making of claims 65, wherein the facion protein further comprises a light

finion proteins comprise a fewy payints and an effector molecule.

- 67. The questions of claims 64 or 66, wherein the signal propriate is an Ompil-Dir.
- 68. This method of clause 68 or 66, wherein the ferry popelule in derived from the 1897 TAT protein, the ammunopedia homosodeman (personals), Kaposi Stratteri growth their (PCF) monitoring requires (PCF), hopes simple, when VPZ, is inchieffer, breakping or issuing their.
 - 69. The method of circles 64, 65 or 66, wherein the effector replaced is a private on assopting elliptic suplement.
- 70. The specified of chains 64, 65 or 66, wherein the attractable tensor-targeted baseers further compaises one or more positionaries to be encoding our or uner official projective operately linked to one or more promoters.
- 78. A method of treating a splid asser cases: in so solical, compening 34 septicionalist one or arous aprenagambanes aform and a hymerocongress combanies comprising a glumma conditionity accompanies exceler and an attenuated in our relationist barrieria comprising our or motor markets and medicales appropriate does at antice priseasy efficient

Westrator

PCTATERONISMS Introducted homeostatected

72. A pacidad di hantinga additi tautor control in to asional, sontroccasi devilutioning case or none educaritoropaeta agorta vida a phomenarcial comportation compristing a plearmounticasily acceptanti control mai na accossiva discoveragianti benedica compristaga con er none melata sodi analomatic sendifus; con er none giftera pellinore metacular and nare or muse sendoring distante sodiorità consisti fishibili del sont er man gentationo, sirvetto anali alternativa transcritagiatal benedità is a fundadrin serrols oci fundadrias sendorita.

rules operably littleed to comer name proximity ria is a fine-landy o sensite on fractitative anne

- The method of chains 78 or 72, whereig at logal our of for primary officers amongston is a YNP featily monator
- 25. The method of class 11 or 72, wherein as here are of the printing effective controlled in an anti-engagenic manual.
- The undered of white 3%, when the order-propries finite is motivated, and produced and produced
 - The month of of plants 71 or 72, returns a true, one of the printery effector resoluted is a besturiscie Emily remains with the province and bearcheds in nor SRP.
- Tis. The protect of churt 17, relateds the bosterioric facility contion is Collin, Collin, Collin Collin, Collin,

970-1978397

PEDERICADO

CORCIO X, Codinio L, Coltain M, chescis DPE3, yespizio A1122, supplylosoccio 1500, busymbia 7435, posta R1 et AFA1, suspisio A316, vilicioto, or microsio 2116

- 79. The mission of electr 71 or 72, whereig at heart one of the primary effector motorale a a pappe in a filter accorde.
- 80. The couled of state 79, wherein the tempelabel tray expuse is methiomes. regressiones, Speen, phospholipeur, presente, Stilrings et givernisse.
- 84. The montred of white 7 F or 72, wherein as host case of the primary effector to molecule is bern shale, verence in CHFs, CHF2, or FMT.
 - fiz. The method of claim 71 or 72, wherein the priority officion avolatele is derived from an animal, plant, becomin, or views.
- 23. The made of claim \$2, wherein the associatory official malecule is an interioristical deligracy argume, an auxil counter promise, ap-p-disagree overting entryme, an existraces
- protectia, a efterpris, et un estigra. \$6. The method of claim 71 or 72, whereis the second of names surgered business no is Salverneils
 - ES. The material of claim 73, wherein the amounts income vary that however, \$1-12 are
- comprises an enhanced release system. \$6. The populat of chins 72, wheele for eccordary effector reciscula is a
- 87. A method of treeting a soluti menter cancer in an animal, conspressing o... A company of motiving a treat control of all placed, companying of administration of the companying of the compa
- A method of thetchey, a solid torrer carror in no passind, comprising
 administrating one or mass observablengende speaks and a pharescentrical compression
 comprising a pharescentrically acceptable marker and as attenuated compression dependence fundament

. 126.

PCTNT886133242 comprising one or more resolute sold stellarship expeding one or more fraing proteins operately linked to one or more parameters, whereive said accounted earner-surpred bacarch-in a Caraktaine south- or facultative assumable and said finition probable composites in force provide and an officeror confermin.

- 89. The contact of chies \$8, whereto sate Susses provide forther comprises a
- SB The portion of them ST or RR, wherein the signal sequence is an Onion-Rise
- 91. The method of obias 65 or 69, wherein the Party popolity is derived from the HIV TAT protot, the arters spotio bencoherent (prostructio), Kupmi fixedator greats factor (PCF) combine-immfeating sequence (AfFS), hopes slaudey visto VF22, boxabintedise, heredysine, or beausaginine.
- 92. The method of chain \$1, \$8 in \$9, wherein the afficure enfoucie is a generally or secondary efficient production.
- 93. The method of claim 87, 87 or 39, wheele the effectated terrestroyed business further comprises one or more certain gold surface lets extending one or more offsetor under the operatory limited to our zerous presentary.
- 94. A morbod of erecting a colid turnor exactor in an animal, computating schaftsferring over or more an enemy or owner survey and a pharmaconited comprosite conferring over or more characteristic control of the control of the conferring over or market control of the control
 - 95. A finion protein computing an Compt-tile protein and an ellower melonite
- 96. A finites proton comprising a agral requires, a firry popiido mid na effector
- 93. The factor procedure folium 96, wherein the regard respenses is so OsspA-like
- 92. The fusion protein of claim 95, wherein the furry papels is during from the HIV TAT precio, the astrompotic bounds eath (personne), Ropes floribles growth factor (FGB) membrane touchousing sequence (ATS), buspes sleeples since VP22,

. 317 -

(225)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

900 (87.8787)	PCPASSOTI242	
possition that besidence, or bacomplaints.		
 The fusion protein of claim 95 primary or recording affector protection. 	og 96, wijeneier the effectes senteculo as a	
•		
_		
10		
15		
26		
15		
50		
35		
	•	
-11R-		

(226)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

SAD GUIDAN

1/42

AND CREATE AND TOTAL TO EACH TOOL TO CAN A ALCO AFT OCT IN VIEWS 25 R. T. P. S. D. K. P. Y. A. C. TO CREATE AND THE ATTEMPT AN

FIG.1

SUBSTITUTE SPEET (RULE 26)

(227)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

PCSICSPATIONS

0410

DEPINATION OF THE VINTZBOOG(sarc--) STRAM.

pQR2.1covC

(SHIC DUMED BY PER INTO (CR2.1)

COL + GOOFFIE RESTRICTION MAINS DEAM MUCLEASE DEGRADATION RELIGATION TRANSFORMATION INTO DAGS

pCR2.18serC (serC DELETION CLONED BY PCR INTO pCR2.1)

Soci + Mad RESTRICTION
ESCLATION OF 880 bp ASSPC CENE
LEGICION INTO 9070442
BRANSFORMATION INTO SMIB CELLS

pc/d442&serc (aero deletion cloned into pc/d442 slockise vector)

SIGN BOOKERS NATE WITH S. SAMORTHON
STRAN 503 TO FROM MERCORPOLID

DESCRIPTION TRANSPORTED BYTO WAP 20009
USING P22 BOOKERSPORTE

WAP 20000X and C") OSTRAND BY SUCKOSE

SELECTION

WAP 20000X and C") OSTRAND BY SUCKOSE

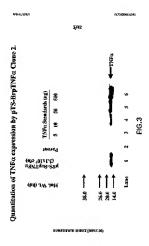
WAP 20000X and C")

FIG.2

SUBSTITUTE SHEET (RULE 20)

(228)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



(229)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

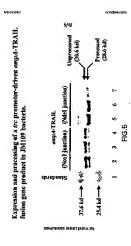
WO INCOME

4/42

AND BAN AND AND CASE AND CASE AND CASE AND CASE THE CREEK AND CASE AND CASE

FIG.4

SUBSTITUTE SIMET (RULE 26)



(231)

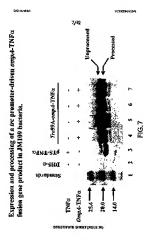
JP 2004-500042 A 2004.1.8

PO HUMBO

6/42

ATE AND AND ACA BUT ATE BUE ANT GOA GITE SCA CITE SCA SET THE OCT ACC ETA ECE CAS ECC CAT ATE ECT AND EAS CITE AND CAS ATE CHE GIC AND TAC TIC AND AND GIC ATT OUT TOT THE TIM AND GIA BUT BYC ART TAT THE BYC FOC AND GRO EAR GAS AND ATTE AND AND OCC TOC TOC CAN GIVE AND TICE CAN CITE CAN CITE GIT ASA AND HIR ALL THE WEY FOR BET BET BY THE BLY BLY BLY BLY BAY ARE CAR CAR ARE ATT THE OUT OF STO MOR GRA AND GET OUT ORS ASA STA GEA GET CAE ATA MET GSS ACC ASA GGA ASA ASE AND ACA THE SET TOT CON AND TOO AND ANT GOA AND GOT CIG GOT ONE ANA ATA AAC TOC TOE GAA TOA TOU ARE ARE ARE ARE GOOD FAT TOA TITC CITE ARE AND THE CAC THE WAR WAS GOT EAR OLD CLIC CALL CAY WAY SEE FT THE THE THE THE TEC CHA AND THE TTT COA TTT CAS GAG GAR ATA ANA GAN AND AND AND AND AND AND AND GAN AND GIT DAN TAIT AFT THE AM THE ALL WELL THE COLL WITH THE THE WAS AND WAS ARET GCT AGA ANT AGT THE TWO TOT ANA BAI GCA GAA THT GGA CTC TAT TO: ATC TAT GAA GOLD GOA AND TITT GAG CTT AND GIA ANT GAC AGA ATT THE ETT SET SET AND AND ENG CAC THE ATE GOOD AND THE ATE CAC CAT ENY BOC WEL ILL ILC BER BOC ILL ILY BUL BOC INY FIG.6

SUBSTITUTE SHRET (RULE 26)



(233)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

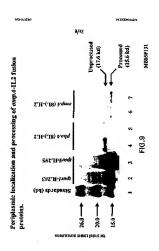
Separated

PCT/READINGS

8/42

FIG.8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)



(235)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

AD IMBRI

10/42

AND MAN AND AND THE ROBE OF THE CITE THE CITE TABLE THE ABOUT HE REST OF STATE AND THE ABOUT HE ABOUT HE REST OF STATE AND THE ABOUT HE ABOUT HE

FIG.10

QUESTITUTE SHEET (RULE 26)

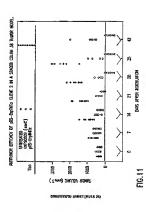
(236)

1P 2004_500042 A 2004.1.8

WO HERBY

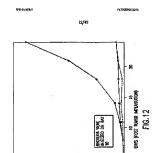
privatelemble

11/42



(237)

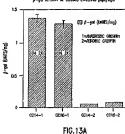
JP 2004-500042 A 2004.1.8



SUBSTITUTE SUBSTIBILIE NO.

(238)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



SURSTRIUTE SHEET (RULE 26)

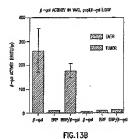
(239)

1P 2004_500042 A 2004 1 8

Date of the column

PERHIPPER

14/40



GURRETTUTE SIEET (RULE 20)

(240)

UP 2004-500042 A 2004-1-8

N/D sturies

PCX/RNOWEDPAY

13/4

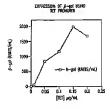


FIG.14

SUBSTITUTE SHEET DRULE 201

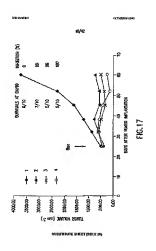
JP 2004-500042 A 2004.1.8

FIG.158

(242) JP 2004-50004
40-новы кстямный
17/42

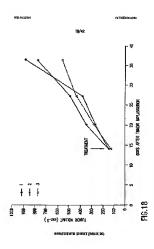
FIG.16

BURSTITUTE STRET (RULE 26)



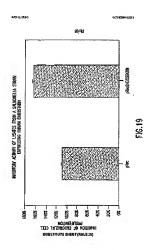
(244)

JP 2004-509042 A 2004.1.8



(245)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

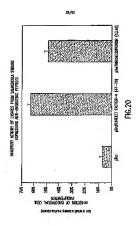


(246)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

With distribute

PCNEOMINAL



(247)

IP 2004-500042 A 2004.1.8

72/42

72/42

Sect | Fig. 2 |

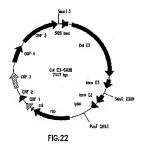
(248)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Set auday

PETATEROUSEN

23/45

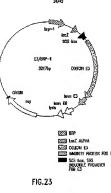


SUBSTITUTE SUBSTITUTE SC

(249)

JP 2004-509042 A 2004.1.8

24/42



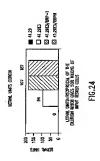
(250)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

NO susta

SCANCERCITIONS

25/42



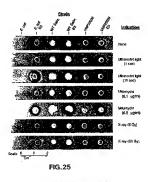
(251)

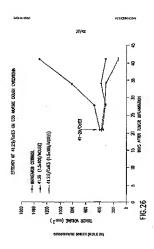
JP 2004-500042 A 2004.1.8

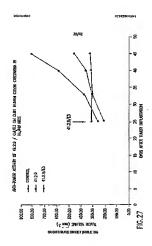
NO INCIDEN

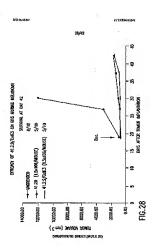
PC100S0021242

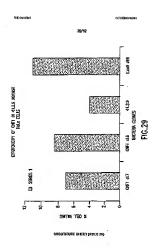
26/42











31/8

Rida unmarred (Str City)

FiG.30A



FIG. 30B substitute sheet (RULE 25)

(257)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

....

PY THE PRODUCT

32/4

AGENT IN TRACTION CONTINUES REQUESTED CONTINUES CONTINUE

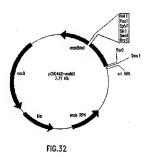
FIG.31

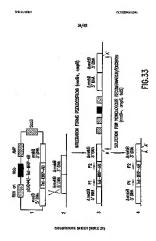
CONSTITUTE STREET (ROLE N

(258)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WO IN A PART OF THE PROPERTY O





(260)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

am months

PCNICEROUSERS

35/4

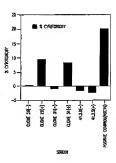


FIG.34

AUDATIVITE DIRECTIONIS AN

(261)

«полити» еспатичнаги

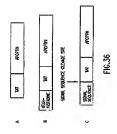
56/42

3P 2004-500042 A 2004.1.8



CURSTITUTE SHEET (RULE 24)

(262) 3P 2004-500042 A 2004.1.8 WG BLUEBOY PCELERBANISHS



AUDATETICS CHEST SAME AS

(263)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Sep existing

PCEATERDROOM

33/42

terin Sequence of 616-4 F

Longth of 616-4 F; 551 bp; Elsted from 1 to: 651: Translated from: 7 to: 629 (Entire region);

Secretic Control and Control a

SUBSTITUTE SINET (RULE 26)

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N... 9/18/2007

(264)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

SATE OF CHILDREN

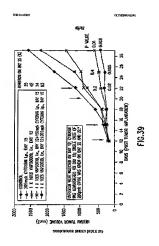
er verstamme

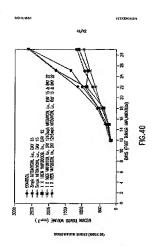
39/42

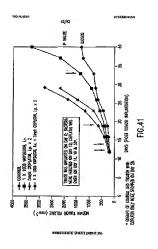
| Transit Anti-Tarrell 1 1457 175 185 (1 1444) | Transit Anti-Tarrell 1 1457 175 185 (1 1444) | Transit Anti-Tarrell 1 1457 175 185 (1 1444) | Transit Anti-Tarrell 1 1457 175 185 (1 1444) | Transit Anti-Tarrell 1 1457 175 185 (1 1444) | Transit Anti-Tarrell 1 1457 185 (1 1445) | Transit Anti-Tarrell 1 1457 185 (1 1455) | Transit Anti-Tarrell 1 1457 (1 1455

FIG.38

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)







Application OCCUPATION AND ADMINISTRATION OCCUPATION OF THE ADMINISTRATION OCCUPATION OF THE ADMINISTRATION OCCUPATION OC

- 117 900 - wyseem to get any to get also plot into the July and the second of the sec

3

The first fi

citto p citto 100 citto 100 citto Antidicial Degrames

GTT AN LATE OF SPRINGER STATE OF THE STATE O

(272)

3P 2004-500042 A 2004.1.8

| Compared | Compared

5

(273)

3P 2004-500042 A 2004.1.8

WD-05/2007

OCTORIO DE LA COMPONIO DEL COMPONIO DEL COMPONIO DE LA COMPONIO DEL COMPONIO DE LA COMPONIO DE LA COMPONIO DEL COMPONIO DE LA COMPONIO DEL COMPONIO DEL COMPONIO DEL COMPONIO DEL COMPONIO DE LA COMPONIO

COLD - Extinction desponses

Application 10 of the 10 of

Fig. (In the she I is for the day the case are day by the time the class for case are day by the class for the class for case and the class for the class fo

· 200: • 200: Punion compressor

<121. C20 <222: (1)...(equ)

+4000 11, +th each ded cody got cuty gogy cuty cuty and beat less ten to peg cuty and the type byte That Albe Caso Albe tens beat less tens to peg cuty and 10

agt gra 200 000 gen gen oet det dye tog dye aet aag dan net cas Sex Sak Alo Sin Alo Nia Nia Nie Sen Ser Sex Tex Eye bye the Cin To

the two top man cat ong one one got one can and out the pat men bry the lev the last Lev Lev Lev Lev Lev Lev Cat Lev Lev Lev Cat 40

nic set san tan tan name out and out and out one one out the san The Amm Ass. Thy Tare Amm Ere has bee 70% and the Lee life she say

ets the sty one are may got not gag one one out one can top our She Tyr Not You typ Eye Alm Thr She the Eye and the Oto typ ten

gas gad gas dag and day day day day day cat and end gas ead tol. one offe one the sale was see Arm Gas Alle day day day.

and ear car car car one one one one one are tor ear arc car gro but arm Now Ris (on Arg Pro Aig Amp wew the dog Amp 124 Amp Vol

act gaz out 500 MKG dag cos ave des son son the end the mas the line has been the Line Gip day that the MKK day been for the Line Sys ${\rm Cip}$ day the MKK day been for the Line Sys ${\rm Cip}$

A CONTROL OF THE PARTY OF THE P

| CONTINUED | CONT

43107 264 43120 PRT +2310 Prtificial Regionice

ATTACHMENT AND ADDRESSES OF THE CONTROL OF THE CONT

(277)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

TO bodge?

The Nat Olive LTS 225 does the was the 180 does to the 180

(278)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Specialists (1) per control of the c

JP 2004-500042 A 2004.1.8

	Womatm									ecvesso	
	- Carrier									ec yreau	Water:
	423.2 1	- 66									
	42124	2004									
	4133	Arci:50	upped Cac	0400							
	£2289										
	45537	Mec) sot	ide pegu	errice est	eegys	Tim:	2 40				
	e-tphs										
9	igitaritges NOOT	551-97015	EG. OEWRO	Strick e	4 Septem	ppet (tureo	1964	92194	totwo	-
	+910+	26									
	48885	101									
	<212+	THE .									
	+213+	Aztitie	in) Year	es co							
	+120+										
	v253s	Ulthern	cynox myr								
	4450.										
er ge	renanceast.	hed belon hed bodon	de sedica de sedica	troop o	Shee rbish	gen e	ecoase o	900	cynos	40099	143
	47105										
	G11s	101									
	an,	BOAK.									
		Arritie	en) sede	dita							
	43791										
	(223)	01150,000	Mont lide								
	<900.										
90	tostacce :	aconcech er-Acare	e acto	checks of	octobia octobia	900 C	estare	tte 1	29309	n tggg	201
	<730	23									
	45320										
	h2720	PET									
	4235>	5070 eep	PLOD!								
	4660+										
No.	t for fee	Vyt Vys	Oly Pre	cha er	201	Ary T	en all	Tev	tev.	rae -	
	4 017 1eu	Seu Leu	Lev Rup	Lon to		Ale Y	te Als	804	13 ₄	Ø) _{rel}	
41	e Clu Olu	20		25 C				10			
91	n rat are	see red	PIP T)P	7HL 41	CW	etro y	ey are	Lye	V)S	oly	
12	o ≣ia Cyc	220 TRE	ATA GIN	100 110	Ale	7az 3	ai lys)			
65 5e	u IJu Oyu	ME A10	Leny (II) n	Ale Pr	e Cenu	95 Ver d	ow love	120	23×	ds Lun	
		85			10	.,			77		
sy	w New Year	200 Oct									
	43110-	20									
	(212)	706									
					**						

Withinstand (CTREADMANN CTREADMANN CTREADMAN

WD-01/28937	PCT/UECHODAY2
-313 + 03:yerudlecules	
460 × 51	
syrygetous tacktoring sylvingtons grapping	37
-930: 3t	
<221> 1117	
<asp min<="" td=""><td></td></asp>	
4283× 3- 4424	
-40C= 74	
ecolistest confittees fedunjaka enterioria chisocied	45 seropopose p
continuous groundent antesgrige augmenting extension coparation resentation obtavionet byschouse autparting	6 gktweeceser 140
Autoridants tamactorat Datestands profession estimototo	g Agtactoric 186 g agtactoric 249
regrected antiquent conscious protesses according consequent	L Leggactese See
detgatigte angelekter represents ketterbye besingte totrpetrog grandspino arphaents copyriges garganges	
eleccedite mecanicite entrelicitiv mendicates esticalities accessions the substitute attention and substitute accessions.	s experience (744
derenouser denductions wicheserts correducte alaboration	Signaturative 1500
portunistic describios colodanas conrectibes destinated	Cigneston 119#
одурскими списубска эксписсках обогатовы песагатий	described 1663
bastanat cartelega de depresante consensos establicas	Phintenger 1806
presenting quiasiques attacquity chargesus encorporation	EBSTATUTE 2359
pigetystyja celegajota alamantyta tegytysttä esetysenes mattrattys egosmostro ascoptynop etystynnes mesocappu	SPRINCENORS 5409
discrepted toatcattet giorgraces congressed starcogness	ESTECHARGE 2766
	Becomeshing 5654

(282)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

		770	

PCYSEON38H2

Woodstate	0534007059	40090555495	potpartero	proceetters.	SCHLEGOLAST	2494
						2561
60000395960	ace iguégit.	r.coopargas	- 099181640G	3366636960	Allogatogung	2800
Checkfold. St.	Suprimer Lang	tenagorage	Ecologica Actions	daggegäntä	ogsettteey	3160
othersets	Billiner	Sparservale	ghtestage	Exagrimogog	twispressor	3224
400FVV3300	DOMESTIC	Mahmara	SECURIORS	egyttitteg	Daniel Second	3344
acceptance of	cohraction	41000001200	3002507777	esseoducac	Anna to a t	25+0
OCCUPATION.	esapatopat	earyane ce	endlb:sked	Sheccologe	Amout 35 £ 83	2304
Change to the	CONTRACTOR	elichensky	protectate	brownsels?	olico Acadese	3566
oft crowd a	2011000101	CONTRACTOR IN	43/ 80463/3	Contract C	SERVICE SERVICE	3488
OACCOONIGE.	ARK BOOK MAN	CURROLOGIC	6100030000	O'DOCCCONTO	denote de se	2544
determinent t.	the specimen	BARCAL CAST	Seasongo	Charles and the Control	With the state of	2601
CONCRETE OF CHILD	customeet	DI CUIS MAN	ectorgrous	AT BOAT DRIVE	Liconcarre	1663
						2778
						2793
						2860
						3960
						5960
ar tragogra	econstations	orpodicane b	eccreomite	ODCITOCATO	becopeauge.	4010
< Magazarea	Scoopsotus.	edidorners.	3056243330	pertrayedto.	STORESPECTO	4010
gornegrang	systematic	Specification	SAMPLINGS	444449030	COSCUESTSC	4340
absconsolv.	0011303588	car each and	oested2csc	ತಿಮಲಾಭಕ್ರಾ ು	acet tappan	6292
4 84 CCF-9950	condition ele-	colduscese	GEOST/CHARA	9462030135	egeapaging	4250
LACINGIAN	TOTAL PLENS	Property and	ecutivipos appopulate	cencertôtô	capacitatin	4324
PARAMETER	anesangung.	waterchire	# photodolas photodolas	Harylange	ecavastast	2389
AND COURT IN	State Contract	desolutions	elmitelettel	1012031031	eGodor with	1100
from object	emethology.	potenti sut	ecacaaccat	adde accion	Sercontage	4564
						462.0
						4110
						1740
						1994
tantetaera	200227900000	cetabbycon	ggoseatose	CHIRCOGOGO	SCENCEDARE	4864
						497.0
Leengoogen.	\$193034550	stonbolbing	cotyananto	RECOGLISIO	GEORGEOUS	652.0
or ghystatt	accexpensa.	ceteregitie	eggotetycu	discougalty	0000000000	6049
SCIPATIONS.	SACTO CREATE	Demontact.	eccupation	CONTROL	toszecsegt	8140
Perchiacca	constant	CESSOOMET'S	egesect see	evilobisch	Ağatınçamya	1140
Alexandrein	ererenosin	estilioned2.30	gyrtgerote ttrylouggy	detatrocco	ded são de ro	522.9
~~~	handladade.	moje receipt	SHEOSONACH	annier cear	0404036232	524 9 524 9
et money money	negretatoon	CCCC MODERN	t teponggaa	201000000	Brerateria	5610
OGSCOOTS OF	OF BUILDINGS	COCOCACCAC	<b>GOOGLES</b>	BOLLANCON,	CONTRACTOR OF	5460
6300000000	0160154035	ATROPOGRACES	grassacces	CONTRACTOR	OFFICE CONTRACTOR	1616
						9500
						554.0
						674 0
						5760
						2000
						5600
distributes.	<b>pecaticies</b>	PEROSSOSAN	guccognoto	<b>DESCRIPTION</b>	geograticas	5540
Stoacecet;	tcogegarte	deck Dayone	91020C0914	ceganitace	0055577000	5000
accompeti.e	Policy and the real of	460erecate	ENGINEERICE	nederdown	Contrapportry	0.040
edvenbred!	ggeort coap	Beach toller	eggesttten	*****	tirtaen toppe	9120
Andreads.		O RESAMPLES	ectoberages gesootgyeg	C393##2C30	PERSONAL 18	6286
DO NOW MYCOC	CONCORPORATE OF THE PARTY OF TH	chr01:00335	Silent teleca Silenosti inti	CHUCOGOCOC	Directores	6200
ereshquent.	er-optiviso	Archeloma.	Munitable	States or	~234Bc18B3	0,41

45

	71621823U+2
Stokerings provingers opposition absorbers elected to resecute	n: 6944
conditionate solidantified activations absolutions associated activations	NG 4434
Satemente concepted authorization contractor areas	21: 4434
Section of the sectio	OF 6344
Schapent congrison Layoungton bingesting speakers required generation government actification gaggetypore testampes through	NO 6500
programme typecypists attituitte ougopaque openagetap tagestas	AD 6800
supposited described phinodeon distracted described systematic	OC 6725
CONTRACTO TOWNS OFFICE	00 5799
cartificate transcoluge governgen geographes outergated presents	OD 5944
tragingray gatterages entragetost disposants acquisiting gaginty	ct 6941
elignegroj ticegnates asserzacou egarappera etaperaria basienas	on 2020
Glosdepard degenerate enveragers accongnist assumment specifical	ta 7000
dardodding dagosbesca ddoseoseca wolecido	7131
c210a 16	
427+ 10	
4213- 1000	
4933 Artitrosef Arguston	
4296a	
citis formed prints	
c490 > 35	
Solicios de constitue de constitues	
A-G-carfor mandidamen absolutes	2
42700 36	
4243 bb	
4712> DIVI	
42830 Artificial Sequence	
833/67	
4273+ Retristo publicar	
4495 M	
chondedeed dademacen saustonessa ditina	3
43Mo 37	
421a 37	
-010: DUA	
egajo Actificial Dequence	
(120)	
4322+ Petvord pricer	
4400: 27	
fogitucates: standarestt strescept georoge	3
-210: 38	
421/> 29	
4212h (DR)	
+233> Brtificael Reguence	
#220a	
+131» Merrorse primer	

(284)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

Wib 0x30097	PCVISIONQUEZ
4690/ 30	
delections amplicates weadedorful	29
r2 Hn. 34	
4133a 27	
4230: 10A	
watte Artiformi Augustos	
1889	
42200 Populating be faced	
+400v 39	
anglesystem becommonen oncresent tangles	37
attitu en	
43331-20	
V223+ 050	
walls Artificial Sequence	
+030+	
-2257 Revente prints	
1599e of	
nucugates stategamen populations	29
<230> 47	
19217-02	
+350 BEL	
e213- Armificial Seguence	
4210~	
<2523 Forward primer	
<4650 41	
Etisty-mite automated emiliality acceptance	10
12191 G	
1222a 87	
4212¢ 56A	
4913+ Artificial degrence	
«P30)	
*910+ Soverse prints	
-410- 42	
distance districted commands deceparing creatactic cole	##0got 60
	**
<\$1,90 +3	
engle of	
4373 - 100E	
wills Aveitheint Sequence	
·216,	
<333) » Forward prints	
e-100y 43	
Gritzmente abinggawyn weddinddelid ealledadhus coddardwe aber	Zánikos 44
17	

 $http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21\&N0400=image/gif\&N0401=/N... \ \ 9/18/2007$ 

WD 0x20197	PCYFURNISHA
Chiganolog e	
4310) 64	
1212- 17	
(2.12) ASA	
of the Artificial Employing	
4320-	
1939- Mileson Bartan.	
440Pp 44	
diffectiobed duewrenca redonates nearlice	
418+ 45	
4211- 45	
<232 BPA <2731 Artificial Degreence	
J376)	
(221) Toxyara prints	
1000 46	
prepared alteratives apparence endemotes model	
4229A 98	
<23(1> 06	
-F239 DAA	
+20% Artsfirinl Sequence	
4210r	
-813+ MAINERS DELINIE	
-489> c#	
ttttttesije teesepijen afneremiji taanuarig sjujin	
4310° 07	
*841× 81	
4711 - 16k	
ality Brillinial toquens	
47211	
+200+ Forward primor	
4408> 47	
еодисивада рёрнобарям оннонайозя пов	
(210) 18	
411.11	
erico rea erico detidonad Comunica	
42201	
<270 - Breeze privar	
<4005 40	
ayangament taggerning collegester ctg	4
4520- 19	

WD-05/2899	CFF0E1628142
-210- 100	
-CLUB- DIM	
413> Artificio) September	
dit.	
<215- Oligomolmoside	
erph ss	
derocceobs acceptabed servereds adjusted accession cabas	DECKE #
dredernoon ednebblone denmetebre efendeppolit da	16
eX18+ 50	
*Tile 183	
42735 ETB	
-673, Armitteini Superent	
-200	
-2219 Oliganusteacies	
450As 46	
SELECTION CONTRACTOR CONTRACTOR CONTRACTOR EXCEPTIONS PROFILE	DILEE ES
schoolstic linebelies Shokkinder ecohirdin chi	9)LCE 04
250x 51	
*012 36G	
+712+ DIA	
+319+ ATTSTITUDE Segundon	
42201	
4937- ObjecomeReature	
4400x S1	
annered dentations executives entendades deleganted deleganted	1000 61
source delta redestroute dissistantes desconance de	163
*335 × 52	
4541× 314	
4217» 266.	
-2)3× Juni49cia i dequence	
#E20s	
+2279 Oligamentmoulds	
c460+ 55	
communication proportions agreement transporate entropies passes tagateesing adjectives agreement transpolita temperature p	1000g 40
12101 63	
(Z11) 111	
422.0 000	
4273> Artificial Segunno	
e2285	
4223+ Diagonouleotrine	
4600. 50	
excellentes accommon communical educations errocatives accept	ACCC 99
efectedates defendables edisplation publicated theoretical a	123

 NOT DESCRIPTION OF THE PARTY OF

4210> 50 4213+ 444 | Compared to the compared to

http://www4.ipdl.inpit.go.jp/tjcontentdben.ipdl?N0000=21&N0400=image/gif&N0401=/N... 9/18/2007-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000-10000

(290)

JP 2004-500042 A 2004.1.8

WD-02/09397

or venous as a

4319-393 4319-393 4329-555 4319-551masth

23

## 【国際公開パンフレット (コレクトバージョン)】



## 【国際調査報告】

	INTERNATIONAL SEARCH WIPON	82	Control miles and control	inglies Ma.	
			9C3Uniosane		
STORIGE	ENTITION OF ENGINEER BANKS : ANY 2005, 34412 : 454 2001, 2143, 2001 Market Banks Confederate Comment	pathod chocking	28048		
Manager de U.S. s d	nazauta natul aknikom njemimo Sv 2061, 291.), 281.)	l le stantierios e	patatry		
BANK LOCK	es encied also live surum el construction el i	tomeracist sub-	iorena en parteco	A is the Eights sourced	
Berrych a MESIJPE,	as low essence of duting the Lorenseppel second for What	prefats un su	, warre provincely,	mater bottle record	
	WHAT CHARGE IN STREET				
CHALL.	Control of demands, with industries, where	ecorporati, of the	Michael expuses	Service to country	
X	Committee of the Commit			43.55	
×	NOTHINGS ON WILLEY or all selections (MEGILID.1993), pages 1. 10-155			25.12,84.25,96.76,7 #8.86	
×	RANKLEK o. pl., "Rugge: Varyetta bilancera az a biswa Archesor Vator". Currer Tanzanto. Vol. 97. Ostaber (1971, arper grada LOW o. pl., "Lippi A madari Bilance Marchin Rippinson mandatas una 1760 antisarca.			1,9,12,96,25,36,36,7 33,56	
×				ASSETT OF THE PARTY OF THE PART	
Ÿ	enals analyticing is ever. Plant Streetherings, Vol. 15, servey 1000, select George see page 18, successman			1	
۲	BANKS of At, "Tracer Inducated Stops safety are all Sound count of Traces 185° agint", Case Det. Manuscrets.	meningt vibiles sape Vist 4.0% 13.0%	etting a mendeuro- region 1997,	1,4,33,38,99,76	
	references on Forsi in the company of the C. This course is the force of the C. All the trape of the graphs		os focily as you man planted on their or a company on a company		
	nue rannen. Egittäide on ja in Epokälder) en er sjörrine mystempall Ejegrie he	* 500	Carbible element in	Shellmannam's	
4400		T -	operations to	risioni irradurvum ir reigijarap piagi d	
	ranne, na manon ur ekitor rév em	Maj in		•	
2770	nymae yeron-waanad Digwess bermak ordina		rootkreidzare, pra		
	cumpt county a training that September 19 extern		Contraction to	3 APR 2001	
Mary 1741	MIKE MEDICANIA (SAMS)	AND DECK OF			
	rounders of they rest industria s PCT stages, O.C. 2001	15 Marie	2 Hocher	cc 564	
Security 2	EN CHERTOSI-TICAN	Territory 2%	83-168-0666		

	INTERNATIONAL SEARCH BARONS	No. received implication No.		
			a	
C (Confe	BECK BOOMENTS ON SOCIETO TO BE SOUTH			
- Second	Claim discuss. 46-46-cm chrogopolius zide man	KINNE	Recorded the	
£4	Classical Country, wis-state, an effect appropriate playment Debt in 6. "Unimed despired to provide country appropriately separate country gate right." Constructive Vol. 12, No. 16, Apr. 188, Liberton State	O CONTROL OFFI	32.400	
1				
1			1	
1			1	
1			i	
1			1	
i			1	
ı			I	
1			I	
1	1		I	
1	i		I	
1			1	
1	1		1	
1			1	
1			1	
1				
1			1	
ļ			l	
1			1	
1			1	
I	Į.		1 :	
!			1	
1			1 :	
1			1	
1			1	
1	1		1	
1			1	
1			1	
1			1	
1			i	
1			1	
1			1	
ı	ì		1	
1			1	
TON POTUS	COLD (CASTANGED of ROWS 1992) (CASTA CASTA)			

	BALERO	ATRONAL SEA	RCE SEPORT	۳	canastry allays	wilan Nb.
				l P	CEALSTON STATE	
			forming sectable (			
The lewester	ceny solari para	n lent chicotas tu	Open of Hotel Sacra t	nder fasch	Chief Scribe le	DS U 2 IOPROS
	Oslades beside day ré	ni na suction, mention	a fast and a fact of the section of	нути ледо	ecy, awargs	
	Way memai s germentak at Ginst yen i	ye yepyesi din lem ye yepyesi din lem	microbappionics for a mortificant en in a	do mai securit. Land aga, spec	out the principle (furty)	si uceanilysa bo
۵ 🗀	Chin Not.	المراجعة المراجعة	an en en la la la mana	ucrafé és	HW CFERS	ongene of Edw
SCA D Ob	ocera tiona véu	re unity of investor	A holding Albertane	ten of berr	2-ed flow sizes()	
Par house Parachico	igel Statistics : nor age in Type	oure too mign	icentere is hill open	arines equips	Bird, sy felborg:	
, □	And rectilising And rectilising procedured and August refuser August refus	er. Ir albiters constitute energy appropriate den. Ir an errordent considerati	eza dzesje politike det sp Jest krijtymu učitel potrky I sporzh lees erza razelej de Grou deze polit, sporud	operation operation	on for, sick water	edy did not whole
* [	is gauge part to a	to investigation that depend The address of many	r Jacob, parithly the appl need by the status; if 6 or part two terrosqualet and the payment of old to	ne des albes	lgenion Kiepneo	(Pael stant apro
Name (Child	All surius	word first them; yet	ly 1980			

STOTIONAL PORMAN, TRANSPORMENT STATEMENT OF THE STOTIONAL PORMAN STATEMENT S

JP 2004-500042 A 2004.1.8

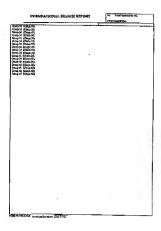
NYTERANTONIA, ARCHAOL RECORD TO PROPER TO PROPE TO PROPER TO PROPE TO PROPE

JP 2004-500042 A 2004.1.8

	INTERNATIONAL SEARCH REPORT	ECTREMONIA
		PCT/URGOING
custs Tr	Charles 12,70 mt. Al. A. Colore to a mortist for modify electric compris	CAS GEORGE CONTRACTOR OF THE PROPERTY AND
Care 30, spruit.	ealing) 13,70-40,87,64, devel in a material for tradespropour enough	erflesparjamenterf can et lann-tpatrompandent
Omp XI, specia	сылару № Макент Эм. Самана и в порым по учербу откого очену и	ing administrating upon qui compression may after
Checy 52, 15 ⁷⁶⁴	richtet 77,0 42,0c, daam journalist habenise essar outpride	HERMITORING SERVICE SERVICES
Chick-CV	emic (0.70, for 42, for, dervices a contact for unphenomenous companions	my or process of the comment of the
01N9-41,-	deland 7,55 St, Gran to send of thropolog dates, consequent at	Marries and or the statement of the state
03942	elektric 73,550%, davis to sentilize for morror encorporagions at	thinking our material state of the spirit
Desp-6%	chings 71,50, charges a person for manipular congruent constraint	work of the company of the party of the part
9944	etaloji) 12,86, doverne e methot fry costing secone comprising setom	NAMES OF STREET
Coop da, Name	riging typically garden inspect, mentions, colored	egyppianal eff elemen spepulsenhole
Georgia, 1	eldings 1866, dansa e a susteni fir campinessor escreting rands	Michigan and American American
Comp+1, 1	risking of the given armina for unally observably fining althoughts	SECURIOR SOCIAL PROPERTY PROPERTY AND ADDRESS.
Grapal,	chings (KSR, Charles in Managerooks.	
Ome et, o	dunto 1699, amus es a Apiro provio.	
Late or speed	al pou media con sugne sprando mái po consistión mách amb pranctic provincia propriata provincia provincia de la constitución d	tog the leastless to article bostom with
MHnA	is the fick white Groupe propries on election of greater	
Oming (C) Orași (C) Orași (C) Orași (C) Orași (C) Orași (C) Orași (C) Orași (C) Orași (C) Orași (C)	Marie 45 Parte 45 Tales 15 Tales 15 Tales 15 Tales 15	

(298)

JP 2004-500042 A 2004.1.8



フロントページの続き				
(51) Int.Cl.'	FI			テーマコード(参考)
A61K 48/00	A61P	43/00	105	
A 6 1 P 35/90	C07K	7/06		
A61P 43/00	C07K	14/035		
C07K 7/06	C07K	14/16		
CO7K 14/035	C07K	14/225		
CO7K 14/16	C07K	14/50		
CO7K 14/225	C07K	19/00		
C 0 7 K 14/50	C12N	1/21		
C07K 19/00	A61K	37/48		
C12N 1/21	A61K	37/02		

```
(72)発明者 バームデス、デヴィッド、ジー。
       アメリカ合衆国 06492 コネティカット州、ウォーリングフォード、ノース メイン スト
       9-1 524
(72)発明者 キング、イヴァン、シー、
       アメリカ合衆国 06473 コネティカット州、ニュー ヘブン ブルー ヒルズ ロード 6
(72)発明者 クレアモント、キャロライン、エー。
       アメリカ合衆国 06410 コネティカット州、チェシャー、マーウィン サークル 80
(72)発明者 リン、スタンレー、エル、
       アメリカ合衆国 06443 コネティカット州、マディソン、オールド トール ロード 17
(72)発明者 ベルコート、マイケル
       アメリカ合衆国 06942 コネティカット州、ウォーリングフォード、アルゴンキン ドライ
Fターム(参考) 48624 AA01 BA28 BA39 CA94 DA65 HA17
         48065 AA46X AB01 CA24 CA31 CA44
         4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 AA19 BA03 CA53 DC02 DC22 DC50
            MAG2 NA14 ZB212 ZR262
         4C087 AAG1 AAG2 AAG3 BC35 CAG9 NAG2 NA14 ZB21 ZB26
```

4HO45 AA10 AA30 BA10 BA41 DA01 DA14 BA83 DAS9 EA20 FA74